

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ/UNICENTRO
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

MARIANE BUTIK

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
METAIS (Cu, Fe, Mn e Zn) EM TECIDO ANIMAL POR FAAS

GUARAPUAVA - PR

2017

MARIANE BUTIK

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
METAIS (Cu, Fe, Mn e Zn) EM TECIDO ANIMAL POR FAAS

Dissertação apresentada sob a orientação da Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia e coorientação do Prof. Dr. Jayme Augusto Peres, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste.

GUARAPUAVA - PR
2017

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

B984v Butik, Mariane
Validação de metodologias analíticas para a quantificação de metais (Cu, Fe, Mn e Zn) em tecido animal por FAAS / Mariane Butik. -- Guarapuava, 2017
xii, 89 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2017

Orientadora: Sueli Pércio Quináia
Coorientador: Jayme Augusto Peres
Banca examinadora: Sueli Pércio Quináia, Maria Lurdes Felsner, Danielle Caroline Schnitzler, Jayme Augusto Peres

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. Tecido biológico. 4. Digestão ácida. 5. Solubilização alcalina. 6. Validação de método. 7. Íons metálicos. 8. Espectrometria de absorção atômica em chama. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sempre iluminar meu caminho, me dando forças para que mais essa etapa chegasse ao fim.

Agradeço a minha família, pelo apoio e incentivo. Aos meus pais Geraldo e Célia pelo esforço, empenho e dedicação para que eu realizasse meus sonhos. Por todas as palavras de incentivo e por acreditar em mim. A minha irmã Viviane por ser minha amiga e companheira durante toda minha vida.

Agradeço a minha orientadora professora Dra Sueli Pércio Quináia, por toda orientação e disponibilidade em ajudar durante toda a realização do trabalho e por ser um exemplo de pessoa e de profissional.

Agradeço ao meu coorientador professor Dr. Jayme Augusto Peres por toda orientação, auxílio e por ter disponibilizado as amostras para a realização desse projeto.

Agradeço a todos os amigos e colegas do Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGATI), pela amizade, ajuda e auxílio em todos os momentos. Agradeço ao aluno Rafael pelo auxílio no laboratório. E agradeço ao Irineo, pela amizade, companheirismo e toda a ajuda desde o início dessa caminhada.

Agradeço ao Ministério Universidade Renovadas (MUR) e ao Grupo de Oração Universitário (GOU) Seu Amor é Deus, amigos que pela fé se tornaram uma família.

Agradeço a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Química pelas contribuições e todas as orientações durante o período do mestrado.

Enfim, agradeço todos que de alguma forma me apoiaram, acreditaram e estiveram comigo em todos os momentos, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

*“É como está escrito: Coisas que os olhos não viram,
nem os ouvidos ouviram, nem o coração humano imaginou,
tais são os bens que Deus tem preparado para aqueles que o amam”.*

1 Coríntios 2, 9

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

Filipenses 4, 13

RESUMO

Os metais essenciais são importantes no funcionamento normal do organismo, porém quando existe deficiência ou excesso desses elementos, o organismo não consegue completar seu ciclo normal e/ou ter um crescimento saudável. Na literatura existem trabalhos que descrevem que elementos essenciais podem estar relacionados com o surgimento de neoplasias. Normalmente, as metodologias encontradas na literatura para a digestão de tecidos biológicos são demoradas e utilizam quantidade elevadas de reagentes. Portanto, destaca-se a importância de desenvolver metodologias analíticas rápidas e de menor custo para a determinação das espécies metálicas em amostras biológicas, a fim de relacionar a concentração dessas espécies ao surgimento de neoplasias. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar metodologias analíticas para a quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos animais com e sem neoplasias, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS). Dois métodos de preparo de amostra foram avaliados: a digestão ácida utilizando HNO₃ e a solubilização alcalina dos tecidos utilizando Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH), ambas com aquecimento por bloco digestor. O estudo de validação analítica foi avaliado pelos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. O tempo necessário para a digestão ácida foi de 1h 30 min e para a solubilização alcalina foi de 1 h. As recuperações obtidas na digestão ácida foram de 105,5% para Cu, 103,3% para Fe, 94,9% para Mn e 89,6% para Zn e na solubilização alcalina foram de 100,8% para Cu, 98,7% para Fe, 103,7% para Mn e 95,7% para Zn, sendo que todas as recuperações foram adequadas para a faixa de concentração estudada. Após a validação das duas metodologias analíticas optou-se por aplicar a solubilização alcalina em 31 amostras de tecidos biológicos (mama, pâncreas, pele e testículos caninos) com e sem neoplasias nas quantificações de Cu, Fe, Mn e Zn. Observaram-se diferenças significativas nas concentrações dos metais em muitas amostras quando comparado o tecido saudável com o tecido neoplásico, porém essas diferenças não seguiram um padrão definido. Uma Análise de Componentes Principais (ACP) indicou que há correlação entre o Fe e o Cu nas amostras avaliadas. Apontou também que os tecidos de testículo possuem maiores concentrações de Zn, enquanto que os tecidos de mama se correlacionaram com os maiores teores de Fe e Cu. As amostras de pele e pâncreas não apresentaram correlação definida com nenhum dos metais.

Palavras-chave: *tecido biológico, digestão ácida, solubilização alcalina, validação de método, íons metálicos, espectrometria de absorção atômica em chama*

ABSTRACT

Essential metals are important in the normal functioning of the body, but when there is deficiency or excess of these elements, the body can not complete its normal cycle and / or healthy growth. In the literature there are studies that describe what essential elements may be related to the appearance of neoplasms. Typically, the methodologies found in the literature for the digestion of biological tissues are time consuming and use high amounts of reagents. Therefore, it is important to develop fast and cost-effective analytical methodologies for the determination of metals in biological samples, in order to relate the concentration of these metals to the appearance of neoplasms. The objective of this work was to optimize and validate analytical methodologies for the quantification of Cu, Fe, Mn and Zn in animal tissues with and without neoplasms using the Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) technique. Two sample preparation methods were evaluated, acid digestion using HNO₃ and alkaline solubilization of tissues using Tetramethylammonium (TMAH) both using digester block. The analytical validation study was evaluated by the parameters of linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The time required for the acid digestion was 1:30 h and for alkaline solubilization it was 1:00 h. The recoveries obtained in the acid digestion were 105.5% for Cu, 103.3% for Fe, 94.9% for Mn and 89.6% for Zn, in the alkaline solubilization were 100.8% Cu, 98, 7% for Fe, 103.7% for Mn and 95.7% for Zn, all recoveries were adequate for the concentration range studied. After validation of the two analytical methodologies, it was decided to apply alkaline solubilization in 31 samples of biological tissues (breast, pancreas, skin and canine testicles) with and without neoplasms in Cu, Fe, Mn and Zn quantification. Significant differences in metal concentrations were observed in many samples when comparing healthy tissue with neoplastic tissue, but these differences did not follow a defined pattern. A Principal Component Analysis (PCA) indicated that there is a correlation between Fe and Cu in the samples evaluated. It also pointed out that the testis tissues have higher concentrations of Zn, whereas the breast tissues correlated with the higher levels of Fe and Cu. The skin and pancreas samples had no definite correlation with any of the metals.

Key words: *Biological tissue, acid digestion, alkaline solubilization, method validation, metal ion, flame atomic absorption spectrometry*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO.....	v
LISTAS DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Metais.....	4
3.1.1 Cobre (Cu).....	5
3.1.2 Ferro (Fe).....	6
3.1.3 Manganês (Mn)	7
3.1.4 Zinco (Zn).....	7
3.2 Cânceres em tecidos animais	8
3.2.1 Câncer de mama	9
3.2.2 Câncer de pâncreas	10
3.2.3 Câncer de pele	11
3.2.4 Câncer em testículos.....	13
3.3 Técnicas analíticas usadas na determinação de metais.....	14
3.4 Métodos de preparo de amostras	16
3.4.1 Digestão por via seca.....	16
3.4.2 Digestão ácida.....	17
3.4.3 Solubilização Alcalina.....	18
3.5 Validação de método analítico.....	20
3.5.1 Linearidade	21
3.5.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	21
3.5.3 Precisão.....	22
3.5.4 Exatidão.....	23

4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Equipamentos e reagentes.....	24
4.2 Amostras	24
4.3 Otimização do preparo das amostras	28
4.3.1 Digestão ácida utilizando chapa de aquecimento e banho-maria	29
4.3.2 Digestão em meio ácido usando bloco digestor	30
4.3.3 Solubilização alcalina do tecido animal	31
4.4 Validação dos métodos para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal por F-AAS.....	32
4.4.1 Curvas de Calibração	32
4.4.2 Linearidade.....	32
4.4.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	33
4.4.4 Precisão	33
4.4.5 Exatidão.....	34
4.5 Análise estatística e avaliação dos resultados por Análise de Componentes Principais (ACP).....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Otimização da digestão ácida em tecido animal	36
5.2 Otimização da solubilização alcalina do tecido animal	41
5.3 Validação	43
5.3.1 Curvas analíticas para o método de preparo de amostra por solubilização alcalina	43
5.3.2 Linearidade.....	47
5.3.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	48
5.3.4 Precisão	49
5.3.4.1 Repetitividade.....	49
5.3.4.2 Precisão intermediária	50
5.3.5 Exatidão.....	52
5.4 Determinação das espécies metálicas em amostras de tecido animal canino	55
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS	75

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica em chama.	15
Figura 2: Curvas analíticas obtidas para a determinação de Cu, Mn, Fe e Zn empregando calibração por padrão externo (●) e por adição com TMAH (■).	44
Figura 3: Gráfico das variáveis (A) e gráfico das amostras envolvendo diferentes tecidos caninos (B) (amostras com neoplasia estão identificadas com a letra C).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do FAAS.	24
Tabela 2: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referentes aos tecidos de glândula mamária utilizadas nesse trabalho.	25
Tabela 3: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de pâncreas utilizados nesse trabalho.	26
Tabela 4: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de peles utilizados nesse trabalho.	26
Tabela 5: Identificação dos animais, raça, idade, doença, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de testículos utilizados nesse trabalho.	27
Tabela 6: Parâmetros utilizados nos procedimentos de digestão ácida.	29
Tabela 7: Parâmetros utilizados nos procedimentos de digestão ácida utilizando o bloco digestor.	31
Tabela 8: Procedimentos avaliados na solubilização alcalina utilizando amostra de testículo bovino.	32
Tabela 9: Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após processos de digestão ácida ($n = 3$).	36
Tabela 10: Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após aplicação do procedimento 8 ($n = 3$).	38
Tabela 11: Resultados das concentrações de Zn oriundos dos brancos digeridos usando tubos com as tampas próprias e com ponteiras de micropipetas.	39
Tabela 12: Recuperação de espécies metálicas ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após aplicação dos procedimentos 9 e 10, ($n = 3$).	40
Tabela 13: Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após aplicação dos procedimentos 1, 2 e 3 com solubilização alcalina ($n = 3$).	42
Tabela 14: Regressão Linear das curvas analíticas na ausência e presença de TMAH para Cu, Mn, Fe e Zn.	45
Tabela 15: Resultados dos coeficientes angulares e seus intervalos de confiança.	46
Tabela 16: Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança realizada em triplicata.	47
Tabela 17: Resultados do <i>teste-t</i> no nível de 95% de confiança para os metais Cu, Fe, Mn e Zn.	48
Tabela 18: Resultados dos valores de LD e LQ (mg kg^{-1}) dos dois métodos propostos para determinações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por F AAS.	49
Tabela 19: Valores da média, intervalos de confianças e RSD para a repetitividade na	

determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de tecido animal.	50
Tabela 20: Resultados da precisão intermediária dos métodos propostos calculados em três dias consecutivos: médias das concentrações, RSD (%) para Cu, Fe, Mn e Zn e valor de Horrat.....	51
Tabela 21: Dados obtidos do <i>teste-F</i> para precisão dos métodos analisados para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn na amostra de tecido animal.	52
Tabela 22: Resultados da média da concentração recuperada e sua porcentagem para Cu, Fe, Mn e Zn na amostra de testículo bovino no nível de 0,25; 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹	53
Tabela 23: Resultados da avaliação de exatidão pela aplicação do <i>teste-t</i> para os métodos na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn de tecido animal por FAAS.....	54
Tabela 24: Concentração (mg kg ⁻¹) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de glândula mamária canina com e sem neoplasias.....	56
Tabela 25: Concentração (mg kg ⁻¹) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de pâncreas canino com e sem neoplasias.	57
Tabela 26: Concentração (mg kg ⁻¹) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de pele canino com e sem neoplasias.....	57
Tabela 27: Concentração (mg kg ⁻¹) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de testículo canino com e sem neoplasias.	58
Tabela 28: Resultados do <i>teste-t</i> pareado nas amostras de glândula mamária canina saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.	59
Tabela 29: Resultados do <i>teste-t</i> pareado nas amostras de pâncreas canino saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.....	60
Tabela 30: Resultados do <i>teste-t</i> pareado nas amostras de pele canina saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.....	60
Tabela 31: Resultados do <i>teste-t</i> pareado nas amostras de testículo canino saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.....	61
Tabela 32: Resultados do <i>teste-t</i> referente aos valores médios de Cu, Fe, Zn e Mn nos tecidos de glândulas mamárias caninas saudáveis e na presença de neoplasia.	62
Tabela 33: Resultados do <i>teste-t</i> contendo as médias, por amostra, para Cu, Fe, Mn e Zn em pâncreas saudável e na presença de neoplasia.....	65
Tabela 34: Resultados do <i>teste-t</i> contendo as médias, por amostra, para Cu, Fe e Zn em pele saudável e com neoplasia.	67
Tabela 35: Resultados do <i>teste-t</i> com as médias para Cu, Fe, Mn e Zn em testículo canino com e sem neoplasia.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

FAAS - do inglês “Flame Atomic Absorption Spectrometry” (Espectrometria Atômica por Absorção em Chama)

IC – Intervalo de confiança

ICH – International Conference on Harmonisation

ICP- OES – do inglês “Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry” (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)

LD- Limite de detecção

LQ- Limite de quantificação

NATA - National Association of Testing Authorities

PCA- do inglês “Principal Component Analysis” Análise de Componentes Principais

r – Coeficiente de correlação

R^2 – Coeficiente de determinação

RSD – Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)

SD – desvio padrão

SRD- Sem raça definida

TMAH- do inglês “Tetramethylammonium Hydroxide” (Hidróxido de Tetrametil Amônio)

UNICENTRO- Universidade Estadual do Centro – Oeste

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento industrial, a liberação de gases da combustão de motores, as explorações da agricultura e da pecuária estão entre as atividades antropogênicas que mais conferem riscos ao bem estar de organismos, expondo-os ao contato com diferentes metais, levando à contaminação de solos, água, plantas e o ar (BAIRD e CAAN, 2011; LEONARD et al., 2004).

Estudos indicam que os poluentes e contaminação do meio ambiente podem ser responsáveis por 90% a 95% dos casos de câncer, enquanto que alterações genômicas representam menos de 10% . Assim, os níveis dos elementos traço quando passam dos limites de concentração adequados ao organismo tornam-se muitas vezes tóxicos (SAGHIRI et al., 2015).

Segundo Cerulli et al. (2006), os fatores ambientais são considerados responsáveis por pelo menos 80% das causas de surgimentos de neoplasias, pois eles influenciam as alterações genéticas que são os principais contribuintes para iniciação, promoção e progressão dos processos tumorais.

A neoplasia é o nome dado a um novo desenvolvimento celular referente a formação e crescimento de um tumor, considerado anormal por se multiplicar e invadir outros órgãos comprometendo sua forma e função, isso ocorrendo por um processo chamado de metástase (MIDIO e MARTINS, 2000).

A causa e origem dos processos neoplásicos são consideradas multifatoriais e um dos fatores pode ser hereditário (MOREAU e SIQUEIRA, 2008). Na carcinogênese, ocorre à associação de um agente considerado tóxico que leva a modificações e a formação de neoplasias. A dose ou concentração desse agente tóxico pode variar a resposta em diferentes espécies, sexo, idade, fatores nutricionais e características do organismo exposto (MIDIO e MARTINS, 2000).

A importância dos metais essenciais é indiscutível devido aos seus papéis positivos quando em concentração específica, enquanto por outro lado exibindo efeitos tóxicos em níveis relativamente altos ou baixos de concentração. Os metais traço essenciais tem as seguintes funções: elementos de estrutura, elementos essenciais para a função hormonal e co-fatores em enzimas (MULWARE, 2013). Nível inadequado ou falta de desses metais essenciais afetará a função estrutural, devido à falta de estabilização e mudança de propriedades, podendo ocorrer acumulação, tornando-se tóxico e causar doenças. A

deficiência de oligoelementos como co-fatores de enzimas expõe o indivíduo ao estresse cancerígeno (MULWARE, 2013). Por exemplo, Zn e Cu participam como co-fatores de enzimas ou diretamente em diversas reações no organismo e são considerados essenciais (ANDRADE et al., 2004).

Os elementos essenciais são espécies químicas utilizadas para manter as funções do organismo normais, por exemplo, Ca, Fe, Zn, Cu e Mg. Quando existe deficiência ou excesso desses elementos, o organismo não consegue completar seu ciclo normal ou ter um crescimento saudável, pois algumas funções biológicas específicas necessitam da presença desses elementos nas proteínas para exercer suas funções (MIDIO e MARTINS, 2000; NUNES et al., 2013; SKRAJNOWSKA et al., 2011).

Já as espécies metálicas tóxicas são consideradas todos aqueles que pertencem a um grupo de elementos que não tem características benéficas e nem essenciais para o organismo, trazendo efeitos prejudiciais às funções metabólicas normais, mesmo que esteja presente em quantidades muito baixas, por exemplo, Pb, Cd e Hg (MIDIO e MARTINS, 2000).

Portanto, destaca-se a importância de desenvolver metodologias analíticas na determinação de metais em amostras biológicas, por métodos mais rápidos e que utilizem menores quantidades de reagentes. Nesse contexto, torna-se relevante a avaliação de estudos relacionando a concentração de metais essenciais ao surgimento de neoplasias, pois não se tem conhecimento se teores maiores ou menores dos mesmos nos tecidos são causados pela presença da neoplasia ou ainda, se são alterações nas concentrações metálicas que causam as neoplasias. Portanto, uma maior compreensão está sendo buscada sobre o papel de diferentes elementos com relação ao surgimentos das neoplasias. A proposta deste trabalho foi de realizar um estudo sobre a correlação da concentração dos metais traços em tecidos de animais com e sem neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a validação de metodologias analíticas para o preparo de amostras e quantificação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos de animais, com e sem neoplasias, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e correlacionar às concentrações dos metais com as neoplasias utilizando ferramentas exploratórias multivariadas.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar os métodos de preparo de amostras para os tecidos animais, em função da massa de amostra, volumes e reagentes utilizados, temperatura e recipientes para a digestão;
- ✓ Validar metodologias analíticas para a quantificação dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos de animais utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS);
- ✓ Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de glândulas mamárias, pâncreas, pele e testículo canino.
- ✓ Coletar informações sobre os diferentes tecidos e neoplasias, associando estes as suas concentrações de metais traço.
- ✓ Correlacionar às concentrações dos metais encontrados nos tecidos neoplásicos e saudáveis utilizando a Análise de Componentes Principais (ACP).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metais

Os metais essenciais desempenham um papel vital nas células. Muitos são fundamentais para várias enzimas no processo bioquímico, elementos de estrutura, elementos essenciais para a função hormonal, entre outras funções (FOUANI et al., 2017; MULWARE, 2013). São elementos químicos utilizados para manter o bom funcionamento do organismo como, por exemplo, o Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Se, Mo, entre outros. São metais essenciais muito importantes devido aos seus papéis positivos quando em concentração específica (FOUANI et al., 2017). Por outro lado, metais essenciais podem se tornar nocivos quando ingeridos em quantidades muito acima das indicações nutricionais (MIDIO e MARTINS, 2000).

Quando existe deficiência desses elementos, o organismo não consegue completar seu ciclo normal ou ter um crescimento saudável, pois algumas funções biológicas específicas necessitam da presença desses elementos nas proteínas para exercer suas funções, como por exemplo, oligoelementos como co-fatores de enzimas expondo riscos a saúde do indivíduo (MIDIO e MARTINS, 2000; MULWARE, 2013; NUNES et al., 2013; SKRAJNOWSKA et al., 2011). A deficiência pode provocar doenças tais como a anemia resultante de deficiência de Fe (FOUANI et al., 2017; MULWARE, 2013).

Nível inadequado de metais essenciais afetará a função estrutural, devido à falta de estabilização e mudança de propriedades, podendo ser prejudicial ocorrendo acúmulo, se tornando tóxico e levando o surgimento de inflamação e cânceres. Por isso, os níveis dos metais essenciais são cuidadosamente mantidos em equilíbrio dentro do organismo (ANDRADE et al., 2004; FOUANI et al., 2017).

As concentrações das espécies metálicas devem ser adequadas dentro das células. A consequência de uma baixa concentração de um elemento essencial é uma influência negativa sobre processos para os quais o íon metálico é necessário. Acima de uma determinada concentração máxima, o elemento essencial tem efeito tóxico (CZARNOWSKI et al., 1997; VIGNERI et al., 2016).

Além dos metais essenciais, existem os metais que não são considerados essenciais tais como o As, Cd, Pb e o Ni que pertencem a um grupo de elementos que não tem características benéficas e nem essenciais para o organismo, que podem ter importantes implicações na saúde trazendo efeitos prejudiciais às funções metabólicas normais, mesmo

que esteja presente em quantidades muito baixas e estes tem sido associados com o desenvolvimento de câncer (MIDIO e MARTINS, 2000; FOUANI et al., 2017).

O papel dos metais principalmente os essenciais no desenvolvimento e inibição do câncer ainda são complexos. É importante descobrir a influência dos níveis dos metais no desenvolvimento ou inibição de tumores. Assim, as concentrações de certos metais podem ser determinadas nos tecidos cancerosos e nos tecidos normais (CZARNOWSKI et al., 1997).

A função biológica dos íons metálicos em combinação com uma investigação da distribuição de elementos em tecidos com tumor e normais do mesmo indivíduo pode dar alguma indicação da influência dos íons metálicos na carcinogênese, que é a formação do câncer (CZARNOWSKI et al., 1997). Porém os efeitos específicos dos diferentes metais, com diferentes concentrações, em diferentes organismos, ainda não é totalmente compreendida (VIGNERI et al., 2016).

3.1.1 Cobre (Cu)

O Cu é um metal essencial para o organismo, contribuindo para muitos processos biológicos (LAPPANO et al., 2016). É um componente essencial de várias enzimas antioxidantes, ajuda na absorção do Fe, além de ser essencial para o aproveitamento da vitamina C. Age como anti-inflamatório, estimulando a imunidade e protege contra doenças cardiovasculares (MONTEIRO, 2013).

Na ingestão de elevadas concentrações pode se tornar tóxico ocorrendo vômitos e danos no fígado (MARTINS, 2011). Seu excesso leva a remoção da vitamina A, diminuindo a vitamina C, contribuindo para esquizofrenia (MONTEIRO, 2013). Sua deficiência leva à diminuição do Fe em alguns tecidos causando anemia (KUO et al., 2004). Pode se acumular no organismo causando a doença de Wilson, um dos sintomas aparente é a formação de um anel dourado na córnea (OE et al., 2016).

Há evidências de que as células cancerosas se proliferam facilmente na presença de alta concentração de Cu, porém existem medicamentos utilizados para baixar a concentração de Cu que resultam na estabilização do tumor (VALKO et al., 2006; FOUANI et al., 2017), podendo ser usado no tratamento de vários tipos de tumores evitando o seu crescimento (LAPPANO et al., 2016).

O Cu tem fortes ligações com metástase, existindo um aumento na absorção de Cu

por células cancerígenas exercendo um papel de promoção da angiogênese, que é o surgimento de novos vasos sanguíneos (FOUANI et al., 2017). A alta concentração de Cu encontrada em tecido com neoplasia de testículo mostra o importante papel deste na promoção do câncer (MULWARE, 2013).

Lappano et al. (2016) relata que em estudos foram encontrados altas concentrações de Cu em sangue de indivíduos com câncer de mama, com isso ocorrendo o aumento da gravidade do tumor.

3.1.2 Ferro (Fe)

O Fe desempenha importantes funções no funcionamento do organismo humano. Cerca de 70 a 80% do Fe consumido vai para as moléculas de hemoglobina que transportam o oxigênio às células em todo o corpo. Também se torna parte da substância mioglobina que é uma proteína que fornece oxigênio aos tecidos musculares. É encontrado no fígado, baço e na medula óssea, mas o armazenamento nesses locais pode esgotar quando houver pouca ingestão deste elemento (ULENE e ULENE, 1995; FOUANI et al., 2017).

O Fe previne anemia, estimula a imunidade, melhora o desempenho físico e previne problemas de aprendizado em crianças. Em quantidades muito pequenas pode causar palidez, irritabilidade, dores de cabeça, pouco apetite e ser vulnerável a doenças. Mas uma dose de aproximadamente 3,0 g pode ser fatal para uma criança (ULENE e ULENE, 1995). A quantidade normal de Fe no organismo é geralmente controlada por ingestão de alimentos que em sua composição contenham esse metal (AKHTER et al., 2005).

Portanto, o Fe desempenha papel em muitas funções fisiopatológicas, porém, também está envolvido na formação de tumores. Tem envolvimento na progressão do câncer, pois as células cancerosas têm níveis mais elevados deste metal, facilitando a metástase e levando a migração e invasão de células de câncer (FOUANI et al., 2017). O seu armazenamento e transporte pode ser diferente em células com tumor, por exemplo, o câncer de mama, pois foram encontrados níveis mais elevados de Fe em indivíduos com câncer de mama do que nos saudáveis. Entretanto, após cirurgia para retirada do tumor seu valor diminuiu 50% (LAPPANO et al., 2016).

Wu et al. (2004) citam em seu trabalho que os níveis mais altos de Fe estão associados a um maior risco de câncer, o que está de acordo com outros estudos na

literatura.

3.1.3 Manganês (Mn)

O metal Mn é considerado essencial, tendo influência na formação da estrutura dos ossos. Sua principal função é auxiliar em reações enzimáticas envolvidas no metabolismo, ajudar na cicatrização de ferimentos e aumentar a tolerância para a glicose, sendo recomendado para diabéticos (HENDLER, 1997; GERUDE, 1995; STIPANUK e CAUDILL, 2012). Também está envolvido em sínteses que são necessárias para o bom funcionamento de processos fisiológicos, incluindo proteínas, lipídios, aminoácidos e metabolismo de carboidratos (LAN et al., 2017).

Quando ingerido em quantidade excessiva se torna um metal tóxico, causando problemas no sistema nervoso central (HENDLER, 1997; GERUDE, 1995; BORNHORST et al., 2010). Mulware (2013), não observou diferença na concentração do Mn em tecidos de rins com e sem tumor e verificou baixas concentrações de Mn em testículo com tumor em comparação ao tecido saudável.

3.1.4 Zinco (Zn)

O Zn, em pequenas quantidades, é um elemento essencial (MARTINS, 2011). No organismo desempenha importante papel, estando presente em todas as células, e sendo encontrado especialmente na musculatura esquelética, nos ossos, na pele e no fígado, além de estar presente também em secreções e fluidos corporais (MONTEIRO, 2013, ULENE e ULENE, 1995; HENDLER, 1997).

Entre os efeitos da deficiência de Zn, se destaca a redução da função imune (MONTEIRO, 2013). A sua ingestão adequada ajuda na prevenção do câncer, da cegueira, sendo útil também, na prevenção e tratamento de resfriados. A falta de Zn retarda o crescimento das crianças e sua deficiência pode provocar a perda de apetite e de cabelos, além de deixar a pele seca e o organismo mais disponível para infecções. A ingestão excessiva de Zn pode causar diarreias, vômitos, cólicas abdominais e dores de cabeça (ULENE e ULENE, 1995; HENDLER, 1997).

O Zn está envolvido em várias funções do organismo como funções em enzimas e proteínas que tem papéis anti-carcinogênicas, por exemplo, é constituinte de radicais livres que combatem a iniciação de tumores. Por outro lado pode também contribuir na formação

de tumores, na sua progressão e na metástase. Com o papel do Zn em enzimas e moléculas que controlam o movimento celular e a invasão, o excesso de Zn pode contribuir para a metástase (LAPPANO et al., 2016; FOUANI et al., 2017) podendo ter uma influência no desenvolvimento de diferentes tumores. Porém o mecanismo correto de como este metal afeta o crescimento de células neoplásicas ainda não é totalmente conhecido (SKRAJONOSWA et al., 2015).

Em estudo realizado por Gallus et al. (2007) foi encontrada associação direta entre o risco elevado de câncer de próstata e o consumo de Zn. Lappano et al. (2016) descreve que foram encontrados maiores concentrações de Zn em tecidos tumorais de mama do que no tecido saudável.

3.2 Cânceres em tecidos animais

O termo neoplasia refere-se a um novo desenvolvimento celular resultando na formação e crescimento de um tumor, isto é, do neoplasma (MIDIO e MARTINS, 2000). Este é considerado anormal pelas células que o compõem por não respeitarem os limites teciduais, se multiplicarem com mitoses atípicas e sofrerem alterações bioquímicas e morfológicas, as quais permitem com que estas invadam outros órgãos, por um processo denominado metástase, além de comprometerem a forma e função dos órgãos aos quais afetam (MIDIO e MARTINS, 2000).

Os processos neoplásicos podem ter comportamentos benigno ou maligno, onde a forma benigna pode evoluir para a maligna quando seu fator etiológico (estudo da causa e origem) for mantido (MIDIO e MARTINS, 2000). Os tumores benignos não formam metástase ou outros tumores secundários em outras partes do corpo. Porém, os tumores malignos podem se infiltrar causando metástase em outros órgãos e tecidos o que torna o tratamento muito mais difícil (MAGALHÃES et al., 2010).

A etiologia do processo neoplásico é multifatorial podendo ter relação desde as formas idiopáticas, isto é, sem que a sua origem seja conhecida, como hereditárias, por agentes físicos, agentes biológicos, agentes químicos, nutricionais, terapêuticas e ambientais (pela presença de contaminantes) (CZARNOWSKI et al., 1997; MOREAU e SIQUEIRA, 2008). Na carcinogênese química, ocorre a associação de um agente tóxico que induz a formação de neoplasias malignas, os denominados cânceres. Sua dose ou

concentração pode variar a resposta em diferentes espécies, sexo, idade, fatores nutricionais e características do organismo exposto (MIDIO e MARTINS, 2000).

3.2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é mais comum em fêmeas, os cães machos apresentam cerca de 1% dos casos de tumores de mama (RIBAS et al., 2012). É uma doença causada por vários fatores, como alterações genéticas levando ao desequilíbrio de multiplicação celular, a instabilidade genética, alteração de genes, entre outros fatores. Esses diferentes fatores contribuem para os diversos comportamentos clínicos e diferentes respostas no tratamento desses tumores, o que dificulta a cura e acaba causando a morte (RANIERI et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Os hormônios sexuais femininos, como o estrógeno, progesterona e hormônio de crescimento tem uma grande relação no desenvolvimento dos tumores de mama. A castração antes do primeiro cio, diminui a chance de se obter o tumor (FONSECA e DALECK, 2000; RIBAS et al., 2012; RANIERI et al., 2013).

Os tumores de mama são a neoplasia mais comum na espécie canina, correspondendo a aproximadamente 42% de todos os tumores e 82% dos tumores em órgãos reprodutores femininos. Sendo que 40% a 50% são tumores considerados malignos e 50% desses tumores malignos podem produzir metástases. O tratamento mais utilizado é a cirurgia para a retirada do tumor, porém em casos de tumores malignos a cirurgia sozinha não cura totalmente (EGENVALL et al., 2005; HERMO et al., 2008; RANIERI et al., 2013).

O tumor surge espontaneamente ao longo de muitos anos, como resultado de múltiplas alterações genéticas. Na espécie canina, o risco de tumores cresce aos 6 anos e aumenta ainda mais entre 9 e 11 anos. Neoplasias mamárias caninas geralmente apresentam nódulos com tamanhos variáveis, consistência e podendo se movimentar para a pele e músculo (RANIERI et al., 2013).

Por causa dos numerosos casos e o potencial de morte, vários estudos são realizados sobre as causas e fatores que levam ao desenvolvimento das neoplasias mamárias. Existem relatos que os cães de raças tais como: Maltês, Poodle, Cocker Spaniels, Daschund, Yorkshire terrier, Pastores Alemães e sem raça definida tem maiores riscos de desenvolver tumores mamários (EGENVALL et al., 2005; RIBAS et al., 2012). O

fato de essas raças terem um maior risco de desenvolver tumores de mama pode ser associado com a sua genética (SORENMO, 2003).

Filgueira et al. (2005) em seu estudo coletou 35 tumores de mama, onde 77,1% foram de neoplasias malignas, 14,3% neoplasias benignas e 8,6% hiperplasias atípicas, que é um padrão anormal mas não cancerígeno. Os casos benignos foram de 40% papiloma intraductal, 40% cistoadenoma e 20% de fibrolipoma. E nos casos malignos foram 70,4% de adenocarcinoma, 18,5% de carcinossarcoma, 7,4% de carcinóide da mama e 3,7% de osteocondrosarcoma.

Em outros estudos com 26 tumores, 7,7% foram de adenocarcinoma sólido simples, 19,23% adenocarcinoma tubular simples, 19,23% adenocarcinoma tubular complexo, 19,23% adenocarcinoma papilífero simples, 7,7% adenocarcinoma papilífero complexo e 26,92% carcinossarcoma (PLIEGO et al., 2008).

3.2.2 Câncer de pâncreas

O pâncreas é uma glândula com funções endócrina e exócrina. A endócrina tem a função de produzir hormônios, como a insulina que na sua falta causa diabetes e a exócrina tem a função de produzir enzimas que dividem em pedaços menores açúcares, proteínas e gorduras para passar pelo intestino, o que é importante para o metabolismo de todo o organismo (BURNIER et al., 2014; HINDLEY et al., 2016).

As doenças que podem envolver o pâncreas são insuficiência pancreática, inflamações e neoplasias. As inflamações no pâncreas, a pancreatite, aumenta o risco de se obter câncer no pâncreas (SONNE et al., 2007). As neoplasias pancreáticas podem ser classificadas como primárias e metastáticas (BURNIER et al., 2014).

As neoplasias primárias em pâncreas em cães acontecem raramente, ficando abaixo dos 0,5% das neoplasias diagnosticadas, sendo que cães fêmeas e cães idosos revelam o maior índice. Os sintomas que podem ocorrer são: perda de peso, vômito, distensão abdominal que são causadas pelo crescimento do tumor, pancreatite que é infecção do pâncreas, sinais de insuficiência do pâncreas, anemia e hiperglicemia, apresentando alta agressividade, comprometendo as funções de outras estruturas. A melhor forma para diagnosticar a neoplasia pancreática é pela biópsia, pois os sinais clínicos não são específicos, necessitando de exames complementares como a ultrassonografia e o histopatológico. O tratamento por procedimento cirúrgico pode aumentar o tempo de vida,

podendo variar de alguns meses a anos, porém a maioria sobrevive menos de um ano (BURNIER et al., 2014; KUNZLER et al., 2013; ROBERTO et al., 2016).

A adenocarcinoma pancreática é uma neoplasia altamente maligna, que se origina do tecido glandular que ocorre raramente em cães e tem alta incidência de metástases em órgãos próximos, como fígado, pulmão e intestino (BURNIER et al., 2014; SONNE et al., 2007). Na maioria dos casos ocorre em animais adultos, podendo surgir em qualquer raça (KUNZLER et al., 2013).

Sonne et al. (2007) identificou as doenças pancreáticas em cães atendidas em uma clínica no período de 5 anos e 6 meses. Nesse período foram necropsiados 1.048 cães com doenças do pâncreas, 70,3% dos casos eram de doenças primárias exócrinas e 29,7% de endócrino pancreático. As doenças mais observadas foram pancreatite com 43,2%, adenocarcinoma pancreática com 21,6%, carcinoma de células beta com 8,1%, atrofia pancreática exócrina com 5,4% e diabetes com 21,6% dos casos analisados.

3.2.3 Câncer de pele

A pele é o órgão maior do corpo humano, sendo composta por dois tecidos, a epiderme e a derme, e corresponde a aproximadamente 16% do peso do corpo humano (ISAAC et al., 2010). A pele tem capacidade de restaurar os tecidos danificados ou perdidos, regenerando os tecidos pelo processo de cicatrização (RITSU et al., 2017).

O câncer de pele e dos tecidos subcutâneo em cães é a neoplasia mais frequente em comparação a tumores de outros órgãos (NARDI et al., 2002), pois a pele é o maior órgão de todos, se tornando a região mais propensa em desenvolver tumores, ficando exposta muitas vezes a ambientes que potencializam o desenvolvimento dos tumores, como por exemplo, a luz solar, que pode ser um fator para predispor tumor como carcinoma de células escamosas. Além disso, por ser constituída de muitas células que são sensíveis ao surgimento de tumores, tem alto índice de renovação assim aumentando o risco de ocorrer mutações (MEIRELLES et al., 2010).

O câncer de pele é invasivo, se espalha e provoca úlceras na camada mais superficial da pele, a epiderme, mas geralmente não causa metástase. Em cães pode ocorrer pela exposição ao sol que emite as radiações ultravioletas e o tumor geralmente se localiza mais nas regiões com pouco pigmento e poucos pelos, maioria dos casos são encontrados na região da cabeça, abdômen e nas patas (BARROS et al., 2008).

Os maiores números de atendimentos em clínicas veterinárias são os casos envolvendo problemas dermatológicos, pois como as alterações na pele são visíveis chamam a atenção dos proprietários, que levam o animal para uma consulta com o veterinário. O diagnóstico mais atendido é por hipersensibilidade à picada de pulgas e o segundo é de tumores de pele (SOUZA et al., 2006).

Os tumores mais encontrados na pele e tecidos subcutâneo de cães são: mastocitomas, adenoma perianal, lipoma, adenoma de glândula sebácea, fibrossarcoma, melanoma, tricoblastoma, histiocitoma, carcinoma de células escamosas, hemangiopericitoma e o carcinoma de células basais, sendo esta última, a mais encontrada (NARDI et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010).

Os mastocitomas são as neoplasias dos mastócitos. São originadas no tecido conjuntivo e na medula óssea, podendo formar tumor em qualquer tecido, mas em torno de 20% dos casos são encontradas em tumores de pele, chegando a 27% dos tumores malignos em cães. As raças que apresentam mais dessa neoplasia são: Boxers, Bulldogs, Basset Hounds, Weimaraners, Boston Terriers, Labrador Retrievers, Beagles, Pointers e Scottish Terriers (NARDI et al., 2002).

Meirelles et al. (2010) no seu estudo analisou protocolos recebidos em um laboratório no período de 5 anos, com 1.869 amostras de pele de cães sendo que 1.002 foram diagnosticadas com tumor de pele, porém 15 desses animais apresentavam dois tipos diferentes de câncer de pele, então o número total de neoplasias foram de 1.017. A origem da neoplasia 50,5% foram de mesenquimal, 45,1% de epitelial, 3,9% de melanocítica e 0,4% de mesenquimal e epitelial. Entre elas 62,3% de neoplasias malignas e 37,7% de benignas. Foi diagnosticado um total de 44 tipos diferentes de neoplasias, sendo a neoplasia mais identificada a de mastocitoma com 22,4%, em seguida carcinoma de células escamosas com 7,45%, depois lipoma com 7,3%, adenoma de glândula perianal com 7,1% e por fim tricoblastoma com 5,8% correspondendo ao total de 50,0% das neoplasias de pele de cães. As demais neoplasias apresentaram porcentagem menor que 5%. Os animais identificados sem raça definida (SRD) apresentaram maiores números de neoplasias, seguidos pelas raças: Poodle, Boxer, Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Rottweiler, Dachshund, Fila Brasileiro, Labrador Retriever, Yorkshire Terrier, Pinscher e Dogue Alemão, totalizando 784 neoplasias, as demais raças apresentaram menos de 15 neoplasias.

3.2.4 Câncer em testículos

Os testículos são órgãos masculinos dos animais sexuais, responsáveis pela produção de espermatozoides e por sintetizar hormônios, como a testosterona (LOPES, 2011). São desenvolvidos na cavidade abdominal e migram para a bolsa escrotal. Nos cães, por volta de 10 dias após o nascimento, os testículos descem da cavidade para o escroto. Quando esse processo não acontece, isto é, a não migração de um ou dos dois testículos da cavidade abdominal para o escroto, o mesmo é denominado de criptorquidismo ou testículo ectópico (LOPES, 2011; ALEIXO et al., 2009).

Os animais com criptorquidismo unilaterais são férteis com uma concentração de esperma menor que o normal, já os bilaterais são estéreis. Podendo ocorrer em até 13% dos animais, considerado um distúrbio comum do desenvolvimento sexual em cães (LOPES, 2011; ALEIXO et al., 2009). Os testículos que apresentam criptorquidismo têm mais chances de desenvolver tumores (LOPES, 2011).

Tumores de testículo são comuns em cães mais velhos, acima dos 5 anos e são geralmente classificados como seminomas, tumores de células de sertoli (sertolioma) ou tumores de células Leydig (células intersticiais), que são as células responsáveis por sintetizar e secretar os hormônios sexuais masculinos e também tumores mistos que são combinações de tumores sertolioma, seminoma e / ou intersticiais. Metástases não são frequentes, mas sertolioma e seminomas podem produzir metástases (ANGÉLICO e SANTOS, 2004; BERTOLDI et al., 2014; LOPES, 2011; ALEIXO et al., 2009).

As neoplasias testiculares representam o segundo tumor mais comum, perdendo apenas para tumores de pele e tecido conjuntivo observados em machos, sendo raramente malignos (ANGÉLICO e SANTOS, 2004). Segundo Bertoldi et al. (2014) 90% dos casos de tumor de testículo em animais domésticos são de cães.

Seminomas em cães estão geralmente associados ao criptorquidismo. É mais comum encontrar seminomas em cães com idade média de 10 anos e são raramente encontrados em cães mais novos (LOPES, 2011).

Nos tumores celular de sertoli, cerca de 10% são malignos com aparecimento de metástase. Os animais com esse tipo de tumor, aproximadamente 25%, apresentam a síndrome de feminização, pois o sertolioma produz estrogênios. O estrogênio em excesso em cães pode levar uma depressão da atividade da medula óssea causando hemorragia. Os

sertoliomas normalmente são unilaterais, podendo ocorrer casos bilateral (ANGÉLICO e SANTOS, 2004; BERTOLDI et al., 2014).

Os estrogênios interferem nas células estaminais, que são células reparadoras dos tecidos danificados substituindo por células novas as que estão morrendo, alterando a utilização do Fe pelas hemácias compostas pela hemoglobina e inibindo a produção do fator estimulante das hemácias em circulação (BERTOLDI et al., 2014).

Os tumores das células intersticiais em cães são bastante relatados na literatura (BETTINI et al., 2006). Raramente encontrado em gato, touro, suíno, caprino e cavalo. Principalmente encontrado em testículo, porém já encontrado na região inguinal e no abdômen, ou seja, testículo criptorquideo (BETTINI et al., 2006).

Os tumores testiculares mistos são mais comuns nos testículos criptorquídicos, podendo ser uni ou bilaterais. O seu comportamento é semelhante ao dos seminomas e tumores das células de sertoli, embora aparentemente não induza síndrome de feminização, sendo na maioria benignos (ALEIXO et al., 2009).

O estudo realizado por Santos et al., (2000) observou tumores testiculares em cães, em que 43,28% correspondia a tumores das células de Leydig, 29,85% de Seminomas e 26,86% de tumores das células de sertoli, e apenas três dos testículos avaliados eram criptorquidas.

ALEIXO et al. (2009), analisaram neoplasias testiculares em cães, sendo que 54% dos casos foram diagnosticados com seminomas, e apenas 8,0% com tumores mistos.

3.3 Técnicas analíticas usadas na determinação de metais

A técnica de análise química para determinação de metais por Espectroscopia de Absorção Atômica conhecida como FAAS (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometric*) teve início em 1955 e foi proposta por Walsh. Em 1965 Willis introduziu a chama óxido nitroso/acetileno que estendeu a faixa de elementos possíveis de leitura em determinações por absorção atômica com chama (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

A espectroscopia de absorção atômica se baseia na quantidade de radiação absorvida pelos átomos neutros no estado fundamental e do elemento de interesse, os quais são produzidos no nebulizador-queimador, e são proporcionais a concentração da solução distribuída na chama (AMORIM et al., 2008; CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Para obtenção desses átomos livres no estado fundamental, inicialmente a amostra é

aspirada, sendo transformada em um fino aerossol que passa pela mistura de gases combustível e oxidante produtores da chama, onde são aquecidas formando um vapor contendo átomos do metal analisado. Aplicando uma energia com comprimento de onda específico as moléculas se dissociam e se transformam em átomos livres no estado fundamental o que irá determinar a quantidade de radiação absorvida. A concentração do elemento em análise pode ser feita através da comparação da absorbância de uma solução padrão com concentração conhecida (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000). O esquema da Figura 1 apresenta os componentes básicos de um equipamento de absorção atômica em chama.

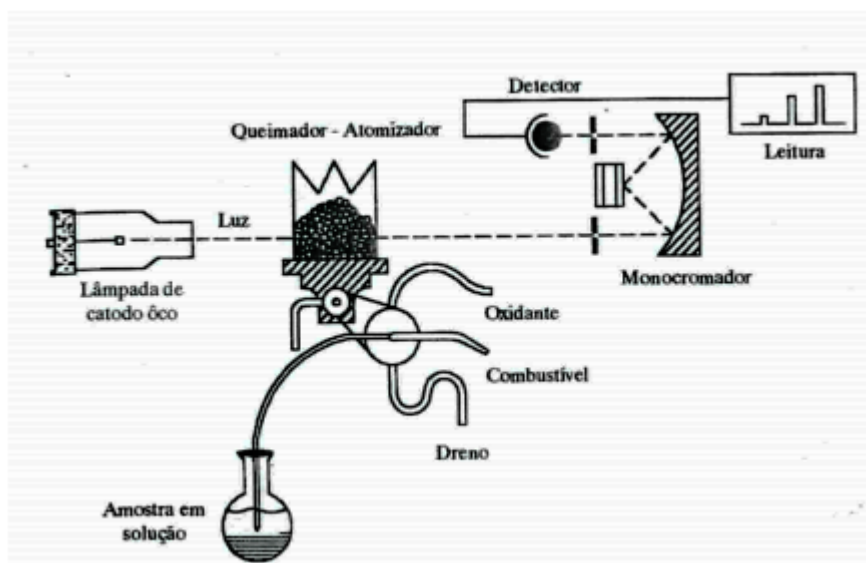


Figura 1: Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica em chama (Fonte: CIENFUEGOS e VAITSMAN (2000)).

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica em Chama é muito utilizada devido a sua simplicidade, baixo custo e o número de publicações utilizando a mesma vem crescendo (AMORIM et al., 2008). Atualmente, com os avanços ópticos e eletrônicos tem contribuído para melhorar ainda mais a técnica de F-AAS na determinação de metais, aumentando sua sensibilidade, precisão e menores limites de detecção. É atualmente uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação de metais em uma grande variedade de matrizes (AMORIM et al., 2008; CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Outras técnicas como a Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) são usadas na determinação de metais em amostras biológicas, e apresentam excelente sensibilidade para metais em concentrações da ordem de ng.mL^{-1} , porém são técnicas que tem maiores

custos em relação a técnica de FAAS (SOUZA et al., 2013; NUNES et al., 2013; CERULLI et al., 2006; GUAN et al., 2010).

3.4 Métodos de preparo de amostras

Para as determinações de metais em amostras biológicas, as mesmas necessitam de um pré-tratamento, normalmente a digestão, que é a decomposição da matéria orgânica e a dissolução das espécies químicas de interesse (NOGUEIRA, 2003).

No que diz respeito às possibilidades de preparação da amostra, existem três procedimentos para decompor a matriz orgânica dos tecidos biológicos nos seus constituintes inorgânicos: calcinação a seco, digestão com placa quente ou digestão com micro-ondas (SOUZA et al., 2013), porém cada método de preparo de amostra é específico para cada matriz, sendo necessário que o método seja otimizado (MAGALHÃES e ARRUDA, 1998).

Os métodos de preparação de amostras devem ser reprodutíveis, rápidos, com capacidade de extrair os analitos que se deseja determinar sem haver contaminação das amostras, minimizando a perda de analitos e que seja compatíveis com a técnica instrumental escolhida (JUROWSKI et al., 2017; AMORIM et al., 2017).

O preparo de amostra para a determinação por FAAS requer tratamentos da amostra que destruam a matéria orgânica, os procedimentos envolvendo a digestão normalmente utilizam ácidos e uma fonte de aquecimento (mufla, bloco digestor, chapa de aquecimento) (AMORIM et al., 2017). Nesse processo o método de preparo é uma etapa muito importante, pois a técnica necessita de precisão e exatidão (ARRUDA e SANTELLI, 1997).

3.4.1 Digestão por via seca

O método de digestão por via seca é chamado de calcinação, no qual ocorre a queima de materiais orgânicos presentes na amostra resultando em cinzas, as quais tem na sua composição somente compostos inorgânicos (HOENIG e KERSABIEC, 1996).

No procedimento de digestão por via seca, o produto do processo de oxidação é uma mistura de sais inorgânicos, que são facilmente dissolvidos num ácido apropriado para cada tipo de amostra. É muito aplicável para determinações de vários metais em diferentes

tipos de amostras, exceto em metais voláteis como Hg, Se e As (NOGUEIRA, 2003).

A etapa de pré-concentração possibilita digerir grandes quantidades de amostra e dissolver as cinzas em um pequeno volume de ácido. Porém, pode haver perda de analito por volatilização caso uma temperatura muito elevada seja usada. Contaminação da amostra também pode acontecer quando os cadinhos ficam abertos dentro do forno mufla e ainda a digestão pode ser incompleta caso o tempo de forno não seja suficiente para a queima de toda a matéria orgânica. Esse método necessita de um longo tempo de preparo e em certos casos a digestão pode levar até alguns dias (NOGUEIRA, 2003).

Durante a calcinação da amostra em forno mufla são utilizadas cápsulas de platina, porcelana ou pyrex. A temperatura usada para a digestão por via seca abrange uma grande escala variando de 200°C até 600°C, porém são mais comumente empregadas temperaturas de 450°C a 500°C (NOGUEIRA, 2003).

Donia, (2008) determinou concentrações de Pb em amostras de músculo, fígado, baço e coração de diferentes animais. Cerca de 5,0 a 10,0 g de amostras foram secas em forno a 100°C por aproximadamente 16h. Em seguida foram calcinadas em forno mufla a 450 - 500°C entre 8 a 12h. Os resultados indicaram que as concentrações de chumbo são dependentes da localidade de amostragem, do órgão e da espécie do animal.

Szkoda e Zmudzki, (2005) determinaram Pb e Cd em músculo bovino e rins suínos. O procedimento foi realizado pesando-se de 2,0 a 10,0 g de amostras, deixando-se secar em forno ($120 \pm 20^\circ\text{C}$) durante uma noite. Em seguida foram calcinados em forno mufla com temperaturas entre 450 a 470°C por aproximadamente 9h. Após, as cinzas foram resfriadas e adicionado 1,0 mL de HNO₃ concentrado, retornando-as para a mufla com temperatura de 450°C por mais 1h. Por fim, as cinzas foram solubilizadas com HCl concentrado (5,0 a 10,0 mL). Os resultados obtidos por esse método foram confiáveis devido aos resultados adequados da validação do método.

3.4.2 Digestão ácida

A digestão ácida é bastante usada no tratamento de amostras para a determinação de metais, pois ocorre a separação do metal na matriz, digerindo a matéria orgânica pelo processo de oxidação, destruindo totalmente a amostra, mas não decompõe os metais traços presentes na amostra (IAL, 2008; MOREAU e SIQUEIRA, 2008).

No método de digestão ácida, as amostras são digeridas através da reação com ácidos, com ou sem aquecimento. Para o aquecimento, podem ser utilizados blocos digestores ou chapas de aquecimento (HOENIG e KERSABIEC, 1996). A temperatura usada é mais baixa comparada com a digestão por via seca, pois os agentes oxidantes presentes na digestão tem a função de destruir toda a matéria orgânica (NOGUEIRA, 2003).

Na digestão por via úmida utilizam-se ácidos como agentes oxidantes e também podem ser usados agentes solubilizantes e neutralizantes que facilitam o processo da digestão (IAL, 2008; MOREAU e SIQUEIRA, 2008).

O ácido nítrico (HNO_3) facilita a volatilidade dos produtos da reação formados durante a decomposição dos compostos orgânicos presentes na matriz e seus sais metálicos remanescentes, são facilmente solúveis. O ácido perclórico (HClO_4) é um excelente agente oxidante, como também o ácido clorídrico (HCl), o ácido sulfúrico (H_2SO_4), o ácido fluorídrico (HF), sendo o HNO_3 o mais utilizado, por ser considerado um poderoso agente oxidante. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um forte agente oxidante muito utilizado em conjunto com o ácido nítrico, formando gás carbônico e água, que são resultados da reação com a matéria orgânica (MOREAU e SIQUEIRA, 2008).

Nunes et al. (2011) determinaram Ca, Cu, Fe e Mg em carnes frescas utilizando 500 mg de amostra, 5,0 mL de HNO_3 concentrado e aquecimento em bloco digestor por 90°C durante 1 h. Após, o digerido resfriado, adicionou-se na sequência 2,0 mL H_2O_2 e aqueceu-se a 90°C por 1 h para finalizar a digestão. Verificaram-se digestão incompleta, necessitando de uma melhor otimização do método.

3.4.3 Solubilização Alcalina

Devido às desvantagens em alguns métodos de digestão alternativos de preparo de amostras, pesquisas continuam sendo desenvolvidas afim de reduzir o tempo de tratamento das amostras, minimizar perdas de analito e proporcionar a capacidade do preparo ser realizado em qualquer laboratório (ARANHA et al., 2016).

Outro recurso que pode ser utilizado no preparo de amostras biológicas é a solubilização alcalina através do uso do Hidróxido de Tetrametil Amônio, $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ (TMAH). O TMAH é uma base orgânica forte com pH alcalino (13,4 - 14,7). É um reagente incolor com forte odor de amina, solúvel em água e em alcoóis, estável em

temperatura ambiente (GROMBONI, 2012; ARANHA et al., 2016). O preparo é simples, pois um pequeno volume do reagente é adicionado na amostra, utilizando pouco (por volta de 60°C) ou nenhum aquecimento. A utilização de temperatura baixa evita perdas de analito (SILVA et al., 2003).

O uso de TMAH surgiu no ano de 1970 para dissolução de materiais biológicos como alternativa à digestão convencional na determinação de compostos inorgânicos. São encontrados trabalhos na literatura empregando o TMAH com ou sem aquecimento, sendo que em alguns casos é utilizada a radiação ultrassônica após a solubilização (GROMBONI, 2012). Extrações alcalinas são interessantes para o preparo de amostras quando há grande número de analitos, por se caracterizar um procedimento de rápida execução e menor consumo de reagentes (GROMBONI, 2012).

É utilizado principalmente para tecidos animais, que se solubilizam facilmente, inclusive eliminando as gorduras. A baixa temperatura utilizada na solubilização elimina o problema de perdas por volatilização e contaminação das amostras (BENDICHO et al., 2012; MARTINS et al., 2002). Na solubilização alcalina por TMAH, o volume usado é muito pequeno, em torno de 1,0 mL e o tempo para a solubilização é muito curto quando comparado aos métodos de digestões ácidas ou por via seca, permitindo o preparo de um número significativo de amostras simultaneamente (ARANHA et al., 2016). Na solubilização alcalina não se faz necessário usar equipamento tal como forno micro-ondas por não utilizar altas temperaturas (SILVA et al., 2003).

Seu uso vem sendo empregado em tratamento de várias amostras, como biodiesel, leite em pó, frutos do mar, tecidos de peixe e muitos tecidos animais (GHISI et al., 2011). A reação do TMAH com o tecido biológico produz uma suspensão estável ou em alguns casos uma solução homogênea, podendo ocorrer formação de espumas e a solução fica mais viscosa. Por mais que a solução formada seja viscosa, é considerada estável e pode ser analisada por técnicas de Espectrometria Atômica por Absorção (EAA) (MARTINS et al., 2002; SOUZA et al., 2013). No tratamento com solubilização alcalina, a amostra é parcialmente destruída, uma parte do analito é extraída na fase aquosa, e a matéria orgânica é volatilizada durante a atomização por EAA e o analito é liberado para ser quantificado (RIBEIRO et al., 2005).

O TMAH é usado na solubilização de várias amostras biológicas para a determinação de vários metais, utilizando as técnicas por chama (FAAS), geração de vapor frio (CV-AAS), atomização eletrotérmica (GFAAS), emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A utilização de TMAH proporciona um preparo rápido e simplificado, o que o torna vantajoso em relação a outros métodos de preparos convencionais. Com uma pureza elevada do reagente TMAH e pequeno volume usado no processo, obtém-se “brancos” excelentes, diminuindo assim os valores do limite de detecção do analito na determinação (MATUSIEWICZ e GOLIK, 2004).

O preparo por calcinação é um método demorado podendo necessitar de até 20 vezes a quantidade de amostra utilizada e até 500 vezes o tempo de preparo das mesmas quando comparado com a solubilização alcalina (ARANHA et al., 2016).

Portanto, destaca-se a importância de se buscar novas metodologias de preparo de amostras na determinação de metais em materiais biológicos, que podem fornecer informações importantes em relação às doenças, sobre o ambiente em que vivem, sua alimentação, entre outros.

3.5. Validação de método analítico

Segunda a ANVISA (2003) “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Portanto, alguns parâmetros como seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão devem ser avaliados para demonstrar que o objetivo do método é adequado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

A validação é uma avaliação que comprova que uma nova metodologia analítica, equipamento ou instrumento geram informações e resultados confiáveis, tornando-se aceitas as suas aplicações e utilizações. Para que um novo método analítico produza resultados confiáveis sobre a amostra ele deve passar por uma avaliação chamada validação, pois cada vez mais se exige a qualidade das medições químicas, através de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (SILVA e ALVES, 2006; RIBANI et al., 2004).

Ribani et al. (2004) definem que a validação de métodos é um processo que se inicia no planejamento analítico e continua no decorrer de todo o seu desenvolvimento.

O método validado deve garantir segurança ao analista e ao meio ambiente, produzindo o mínimo de descartes, pouco consumo de reagentes no preparo e na análise,

tendo etapas rápidas, equipamentos de baixo custo e com isso se torna um método aceitável (CHEN et al., 2008).

Os parâmetros de validação selecionados nesse trabalho para testar o desempenho analítico das metodologias foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, que serão apresentados a seguir.

3.5.1 Linearidade

A linearidade está relacionada com a capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito analisado, em uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). É recomendado para o estudo da linearidade seja utilizada na análise no mínimo de 5 concentrações diferentes do analito de interesse (ANVISA, 2003; ICH, 1996), podendo ser obtida por padronização interna ou externa (INMETRO, 2010).

Se a análise visual dos gráficos seguir uma relação linear, os dados deverão ser tratados por métodos estatísticos específicos afim de determinar fatores que possam demonstrar a linearidade do método, como o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, desvio padrão relativo (RSD %) e a soma residual da regressão linear (ANVISA, 2003). Para que o coeficiente de correlação possa ser considerado ideal a ANVISA (2003) recomenda que o seu valor seja maior ou igual a 0,99, já o INMETRO (2010) recomenda um valor superior a 0,90.

3.5.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

De acordo com a ANVISA (2003) limite de detecção (LD) “é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas”. Portanto, o limite de detecção corresponde a concentração mínima de um analito que pode ser detectado, mas não quantificado, pelo procedimento experimental utilizado (GUILHEN et al., 2010).

Já o limite de quantificação (LQ) segundo a ANVISA (2003) “é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas”. É um parâmetro de validação determinado para ensaios quantitativos de impurezas, e expresso como concentração do analito na

amostra (ANVISA, 2003).

O limite de detecção e o limite de quantificação são calculados pelo método da curva analítica, utilizando os dados da equação da curva de calibração de acordo com ICH (1996) e ANVISA (2003) utilizando as seguintes Equações 1 e 2:

$$LD = \frac{3 SD}{m}$$

(Equação 1)

$$LQ = \frac{10 SD}{m}$$

(Equação 2)

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco

m: inclinação da curva de calibração

3.5.3 Precisão

A precisão é considerada o estudo da proximidade entre a média e dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Podendo ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade (ANVISA, 2003).

A repetitividade é a concordância dos dados obtidos em um curto período de tempo dentro do mesmo laboratório, com o mesmo analista e a mesma instrumentação (ANVISA, 2003; RIBEIRO et al., 2008). A repetitividade é medida por, no mínimo, nove determinações (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária ou precisão inter-corridas é definida pela semelhança dos resultados obtidos no mesmo laboratório, mas por analistas diferentes ou em dias diferentes ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003; RIBEIRO et al., 2008). Segundo a ANVISA (2003), é recomendado que a precisão intermediária seja feita por pelo menos 2 dias diferentes.

Por fim a reprodutividade é determinada pela precisão entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes utilizando a mesma metodologia (ANVISA, 2003; RIBEIRO et al., 2008).

A repetitividade e a precisão intermediária de um método analítico podem ser calculadas pelos desvios padrão relativos (RSD %) de acordo com a Equação 3 (AOAC,

2012):

$$\text{RSD} = \frac{s}{x} \times 100$$

(Equação 3)

Em que:

s é o desvio padrão da média das amostras;

x é a média das amostras.

3.5.4 Exatidão

A exatidão é a semelhança do valor obtido com o valor de referência considerado verdadeiro. A exatidão pode ser obtida aplicando-se a metodologia estudada em uma amostra de pureza conhecida, como padrões certificados ou comparando os resultados da metodologia estudada com os resultados obtidos de uma metodologia analítica validada (ANVISA, 2003; RIBEIRO et al., 2008). Outro método que pode ser obtida a exatidão é de recuperação por adição de padrão, em que são adicionados valores de concentração conhecida de analito na amostra. Podendo ser calculada pela porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra (ANVISA, 2003). Também pode ser determinada pela diferença porcentual entre as médias e o valor adicionado (NATA, 2012; ANVISA, 2003). A exatidão é calculada de acordo com Equação 4 (NATA, 2012).

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100\%$$

(Equação 4)

Onde:

C1: concentração do analito obtido após a fortificação;

C2: concentração do analito na amostra;

C3: concentração do analito adicionado à amostra.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e reagentes

As determinações dos elementos Cu, Fe, Mn e Zn foram realizadas utilizando-se um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (F-AAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometer*) (Varian, modelo Spectra AA-220) equipado com lâmpadas de cátodo oco como fonte de radiação (Varian e Agilent), localizado no Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LabGATI) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Para a atomização foi utilizada chama composta de ar/acetileno. A Tabela 1 apresenta os parâmetros instrumentais utilizados nas medidas realizadas por FAAS.

Utilizou-se nesse trabalho soluções padrão de Cu, Fe, Mn e Zn (1000 µg/mL P.A. - Biotec). Todos reagentes utilizados eram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida pelo sistema Gehaka OS 10LX. Também foram utilizados Ácido Nítrico (Carlo Erba, 65% v/v), Peróxido de Hidrogênio (BIOTEC 35% m/v), TMAH (Sigma-Aldrich, 25% m/v), Bloco digestor (Alfakit, AT 509), chapa de aquecimento (Biomixer 220), e balança analítica (Shimadzu, modelo AUW200D) com precisão $\pm 0,00001$ g.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais do FAAS.

Metal	λ (nm)	i (mA)	fenda (nm)	Chama
Cu	324,7	4	0,5	ar/C ₂ H ₂
Fe	248,3	5	0,2	ar/C ₂ H ₂
Mn	279,5	5	0,2	ar/C ₂ H ₂
Zn	213,9	5	1,0	ar/C ₂ H ₂

4.2 Amostras

As amostras de glândula mamária, testículos, pâncreas e peles, todas da espécie canina foram coletadas no Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da UNICENTRO, sendo estas acondicionadas em sacos plásticos de polietileno, devidamente identificadas e armazenadas em freezer a temperatura de -4°C por aproximadamente 15

dias até o momento de preparo para a análise química referente à determinação dos metais de interesse.

As amostras receberam identificação com letra e número, sendo os tecidos de glândula mamária, pâncreas, pele e testículo, codificados como M1 a M11, PA1 a PA4, P1 a P3 e T1 a T13, respectivamente.

Nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 encontram-se as características dos animais amostrados nesse trabalho.

Tabela 2: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referentes aos tecidos de glândula mamária utilizadas nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Neoplasia	Nutrição
M1	Pincher	F	4,5	Adenocarcinoma papilar inflamatório	Ração e comida caseira
M2	Poodle	F	2,0	Adenocarcinoma papilífero	Ração
M3	SRD	F	4,5	Adenocarcinoma misto cístico	Ração e comida caseira
M4	SRD	F	2,5	Adenocarcinoma misto cístico	Ração
M5	Poodle	F	5,5	Adenocarcinoma nodular difuso	Ração e comida caseira
M6	Poodle	F	5,0	Adenocarcinoma inflamatório	Ração
M7	Pit Bull	F	4,0	Adenocarcinoma misto	Ração
M8	Poodle	F	5,0	Adenocarcinoma misto maligno papilar	Ração
M9	SRD	F	6,0	Adenocarcinoma papilar	Comida caseira
M10	SRD	F	5,5	Adenocarcinoma misto maligno nodular	Comida caseira

(Continua)

(Continuação)

Tabela 2: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referentes aos tecidos de glândula mamária utilizadas nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Neoplasia	Nutrição
M11	SRD	F	4,0	Adenocarcinoma inflamatório	Ração e comida caseira

SRD – Sem Raça Definida
F - Fêmea

Tabela 3: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de pâncreas utilizados nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Neoplasia	Nutrição
PA1	SRD	M	6,5	Adenocarcinoma pancreático	Ração
PA2	York Shire	M	4,5	Adenoarcinoma pancreático	Ração
PA3	SRD	F	Adulta	Hemangioma pancreático	Comida caseira
PA4	SRD	F	Adulta	Adenocarcinoma pancreático	Comida caseira

F – Fêmea; M - Macho
SRD – Sem raça definida
Adulta – idade superior a 7 anos

Tabela 4: Identificação dos animais, raça, idade, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de peles utilizados nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Neoplasia	Nutrição
P1	SRD	M	4,5	Fibroma	Comida caseira
P2	SRD	M	3,0	Cisto epidermoide	Ração
P3	Boxer	M	6,0	Mastocitoma	Ração e comida caseira

M - Macho
SRD – Sem raça definida

Tabela 5: Identificação dos animais, raça, idade, doença, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de testículos utilizados nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Doença	Neoplasia	Nutrição
T1	SRD	M	4	Dermatopatia hormonal	Seminoma	Ração e comida caseira
T2	PASTOR ALEMÃO	M	4	Insuficiência Renal	Sertolioma	Ração e comida caseira
T3	POODLE	M	3	Dermatopatia hormonal e desequilíbrio nutricional	Seminoma e Sertolioma	Ração e comida caseira
T4	LABRADOR	M	6	Neoplasia de pele – Linfoma Cutâneo	Seminoma e Sertolioma	Ração
T5	SRD	M	3	Fratura de membro posterior direito	Sertolioma	Ração e comida caseira
T6	POODLE	M	2,5	Pancreatite	Sertolioma	Ração
T7	ROTWEILER	M	3,5	Dermatopatia hormonal e gastroenterite	Seminoma e Sertolioma	Ração e comida caseira
T8	SRD	M	4	Pneumonia difusa	Seminoma e Sertolioma	Ração e comida caseira
T9	SRD	M	5	Cardiopatia	Seminoma e Sertolioma	Ração e comida caseira
T10	SRD	M	5	Insuficiência renal crônica	Sertolioma	Ração
T11	POODLE	M	4,5	Gastroenterite	Sertolioma	Ração
T12	SRD	M	5	Dermatopatia hormonal e desequilíbrio nutricional	Seminoma e Sertolioma	Comida caseira

(Continua)

(Continuação)

Tabela 5: Identificação dos animais, raça, idade, doença, neoplasia e alimentação referente aos tecidos de testículos utilizados nesse trabalho.

Amostra	Raça	Sexo	Idade (anos)	Doença	Neoplasia	Nutrição
T13	POODLE	M	5	Insuficiência Renal	Seminoma e Sertolioma	Ração

RSD – Sem Raça Definida

DOENÇA – Motivo principal da consulta na Clínica Escola de Medicina Veterinária

NEOPLASIA – Classificação da neoplasia primária do testículo

Os animais que foram coletados os tecidos de glândula mamária e pele chegaram à clínica veterinária para a retirada do processo neoplásico por cirurgia e coleta para biopsia, respectivamente. As amostras de pâncreas foram coletadas para necropsia e todos os animais morreram.

As lesões testiculares que foram estudadas não foram causa mortis e nem a patologia principal do animal, sendo considerados achados de necropsia, ou seja, foram encontrados em pesquisa, sendo outra doença a patologia principal que causou a morte do animal.

A quantidade de amostras de pâncreas e pele utilizados nesse trabalho foram menores em relação às amostras de glândula mamária e testículo, devido à disponibilidade e a chegada dessas amostras no laboratório de patologia da UNICENTRO.

Para a otimização e validação dos métodos avaliados nesse trabalho utilizou-se as amostras de testículos bovinos saudáveis, com idade entre 4 a 6 meses e mestiços, nos quais foram feitos orquiectomia (cirurgia de remoção dos testículos) com a finalidade zootecnia de ganho de peso. Esse tecido animal foi utilizado na validação por apresentar massa suficiente para todo o processo e também por ser uma amostra muito mais complexa do que os tecidos caninos.

O estudo de validação utilizando espécies representativas pode ser aplicado em outras matrizes ou espécies similares (RIBEIRO e GERMANO, 2015).

4.3 Otimização do preparo das amostras

Os procedimentos de preparo de amostras foram otimizados a fim de verificar a

eficiência e celeridade. A otimização do preparo das amostras (digestão ácida e solubilização alcalina) foram feitas com tecidos de testículos bovino saudáveis.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, e cortadas em pedaços (~2,0 mm), em uma base de vidro com faca de aço inoxidável para facilitar a pesagem e a sua digestão ou solubilização. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Todos os frascos e vidrarias utilizados foram devidamente descontaminados em banho de ácido nítrico (HNO₃) 5% (v/v), por 24 horas e posteriormente, lavadas 3 vezes com água deionizada.

4.3.1 Digestão ácida utilizando chapa de aquecimento e banho-maria

Foram testados sete procedimentos de digestão ácida variando-se a massa da amostra (testículo bovino saudável), volume de reagentes, temperatura e tipo de recipiente para o processo das digestões (Tabela 6). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 6: Parâmetros utilizados nos procedimentos de digestão ácida.

Procedimento	Massa (g)	Recipiente	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Volume final (mL)	Aquecimento
1	3,0	Béquer	20,0	2,0	25,0	Chapa de aquecimento
2	0,5	Béquer	20,0	2,0	25,0	Chapa de aquecimento
3	0,5	Tubo criogênico	3,0	1,0	10,0	Banho-maria
4	0,5	Tubo criogênico	1,5	0,5	10,0	Banho-maria
5	1,25	Tubos Falcon	5,0	2,0	10,0	Banho-maria
6	0,5	Tubos Falcon	3,0	1,5	10,0	Banho-maria
7	0,1	Tubos Falcon	3,0	1,0	10,0	Banho-maria

Nos procedimentos 1 e 2, as amostras foram pesadas em béquer de vidro (50,0 mL) adicionando-se na sequência HNO_3 , tampado com vidro relógio e aquecido à temperatura próxima de 100°C em chapa de aquecimento. Após 3h 30 min de aquecimento adicionou-se H_2O_2 , e aqueceu-se por mais 1 h na chapa de aquecimento. Depois de resfriado, o digerido foi avolumado (25,0 mL) e medido por F-AAS para os referidos metais.




Nos procedimentos 3 a 7, as amostras foram pesadas em tubos (criogênico e Falcon), adicionado-se HNO_3 e H_2O_2 (Tabela 6) e em seguida colocados em banho-maria na temperatura de 90°C por 2 horas.

4.3.2 Digestão em meio ácido usando bloco digestor

Novos procedimentos foram avaliados utilizando bloco digestor (Tabela 7). As amostras de testículo bovino foram pesadas diretamente em tubos de vidros com tampa (10,0 mL), adicionando-se na sequência HNO_3 concentrado e H_2O_2 (35% m/v) levando-se em seguida para aquecimento em bloco digestor. Foi utilizada uma rampa de aquecimento para não ocorrer ebulição brusca do material e perda de amostra, contendo 3 etapas: a primeira etapa permaneceu por 5 min após atingir 90°C , depois permaneceu por mais 5 min a 100°C e por último a 130°C , permanecendo também por 5 min, totalizando aproximadamente 1h 30 min o processo de digestão. Após, o digerido foi diluído em balão volumétrico de 10,0 mL com água deionizada e realizada a análise dos referidos metais (procedimento 8).

Dois novos procedimentos foram realizados sem adição de H_2O_2 . Nos procedimentos 9 e 10 substituiu-se as tampas dos tubos de vidro por ponteiros de micropipetas a fim de minimizar a contaminação proveniente das tampas. No procedimento 10 foi variada a massa da amostra para 0,5 g nas mesmas condições do procedimento 9 (Tabela 7). Os procedimentos 8, 9 e 10 também foram realizados em triplicata.

Tabela 7: Parâmetros utilizados nos procedimentos de digestão ácida utilizando o bloco digestor.

Procedimento	Massa (g)	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Rampa de Temperatura (°C)	Frasco de digestão
8	0,3	2,0	1,0	90	
				100	
				130	
9	0,3	2,0	-	90	
				100	
				130	
10	0,5	2,0	-	90	
				100	
				130	

4.3.3 Solubilização alcalina do tecido animal

Avaliou-se também a solubilização alcalina para a determinação de metais nas amostras de testículo bovino. Três procedimentos foram realizados variando-se a massa de amostra, volume de reagente, temperatura e recipiente para o processo de solubilização utilizando o TMAH (Tabela 8).

Tabela 8: Procedimentos avaliados na solubilização alcalina utilizando amostra de testículo bovino.

Procedi mento	Massa (g)	Frasco	TMAH (mL)	H ₂ O (mL)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Volume final (mL)
1	0,5	Tubo Falcon	1,0	-	Ambiente	2	10,0
2	0,5	Tubo Falcon	1,0	0,5	50 (banho- maria)	1	10,0
3	0,3	Tubo de vidro	1,0	0,5	60 (bloco digestor)	1	10,0

4.4 Validação dos métodos para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal por F-AAS

A validação das metodologias propostas para as amostras de tecido animal foram avaliadas pelos parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão de acordo com as recomendações da AOAC (2012), ICH (1996) e NATA (2012).

4.4.1 Curvas de Calibração

Curvas de calibração envolvendo a solubilização alcalina foram realizadas com padrão externo na presença e na ausência de TMAH (5,0 mL), para verificar possíveis interferências causadas pela viscosidade do reagente durante as determinações dos metais por F-AAS. As curvas analíticas foram feitas em triplicata para Cu, Fe, Mn e Zn utilizando faixas de concentração de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹, 0,2 a 1,0 mg L⁻¹, 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ e 0,1 a 0,5 mg L⁻¹, respectivamente. Para a digestão ácida utilizou-se curvas de calibração externa aquosa nas mesmas concentrações anteriormente citadas.

4.4.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas, a partir dos dados de calibração, realizou-se a análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste, no nível de confiança de 95%. O tratamento estatístico foi realizado utilizando o *software* Minitab versão 16.2.2.

A linearidade foi calculada a partir de medidas em triplicata das curvas analíticas para cada metal.

4.4.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para calcular os limites de detecção e de quantificação dos métodos foram realizadas 10 medidas do branco. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados pelo método da curva analítica, de acordo com o ICH (1996) utilizando as seguintes Equações 1 e 2:

$$LD = \frac{3 SD}{m} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LQ = \frac{10 SD}{m} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco

m: inclinação da curva de calibração

4.4.4 Precisão

A precisão dos métodos foi avaliada pelas estimativas de repetitividade e de precisão intermediária para todos os metais de interesse. Além disso foi aplicado um *teste-F* no intuito de avaliar se existem diferenças significativas entre as duas variâncias amostrais ponderadas dos métodos analisados e pelo cálculo de intervalos de confiança para a razão entre as variâncias ponderadas.

Para o estudo de repetitividade, foram preparadas e realizadas três medidas das amostras no mesmo dia. Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram preparadas e medidas em triplicata, durante 03 dias consecutivos. Os valores de repetitividade e precisão intermediária foram calculados pelos desvios padrão relativos (RSD %) de acordo com a Equação 3 (AOAC, 2012):

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que:

s é o desvio padrão da média das amostras;

x é a média das amostras.

Foi também aplicado o cálculo do valor de Horrat para verificar se os métodos apresentavam precisão aceitável nas determinações dos metais de interesse Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos biológicos. Aos dados obtidos pela precisão intermediária foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) no nível de confiança de 95%. Os resultados da ANOVA foram utilizados para o cálculo do valor de Horrat conforme a Equação 5 (GONZÁLEZ et al., 2010):

$$Horrat = \frac{RSD_{pi}}{RSD_{Horwitz}}$$

(Equação 5)

Em que:

RSD_{pi} é o desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD_{Horwitz} é o desvio padrão relativo predito

O RSD_{Horwitz} é calculada pela Equação 6 (GONZÁLEZ et al., 2010):

$$DPR_{Horwitz} = 2 \times C^{-0,15}$$

(Equação 6)

4.4.5 Exatidão

A exatidão dos métodos propostos foi avaliada pela comparação entre métodos analíticos aplicando-se um *teste-t* para verificar se existem diferenças significativas entre as médias amostrais dos métodos analisados no nível de 95% de confiança. A exatidão também foi realizada através de estudos de recuperação por adição de padrão na amostra de acordo com o guia do NATA (2012), onde as amostras analisadas foram fortificadas com dois níveis de concentrações conhecidas para cada metal de interesse de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ para Cu, Fe e Mn, e 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ para Zn, sendo os testes realizados em triplicata para cada concentração. A avaliação da exatidão foi realizada pela taxa de recuperação (%), de acordo com a Equação 4 (NATA, 2012).

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100\%$$

(Equação 4)

Onde:

C1: concentração do analito obtido após a fortificação;

C2: concentração do analito na amostra;

C3: concentração do analito adicionado à amostra.

4.5 Análise estatística e avaliação dos resultados por Análise de Componentes Principais (ACP)

Neste trabalho toda a análise estatística aplicada foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o *software* estatístico Minitab versão 16.2.2. Com a conclusão dos estudos de otimização e de validação, foram analisadas em seguida um total de 31 amostras (11 amostras de mama canina, 13 amostras de testículos canino, 4 amostras de pâncreas canino e 3 amostras de pele canina) de tecido animal envolvendo partes saudáveis e partes com neoplasias a fim de determinar a concentração das espécies metálica Cu, Fe, Mn e Zn. A partir dos dados obtidos, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando o *software* Statistica 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da digestão ácida em tecido animal

Neste trabalho, foram avaliados diferentes procedimentos de digestão ácida com o propósito de diminuir contaminações e perdas dos analitos, utilizando menores quantidades de reagentes e tempo de digestão.

Os resultados obtidos com a digestão ácida utilizando os procedimentos 1 a 7 para determinação dos metais (Cu, Fe, Mn e Zn) nas amostras de testículo bovino não se apresentaram adequados, pois não foram reprodutíveis, devido a perdas e/ou contaminações nas amostras durante as digestões.

Na Tabela 9 estão representadas as porcentagens de recuperação dos procedimentos (1 a 7) de digestão ácida em amostras dopadas com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada metal (Cu, Fe, Mn e Zn).

Tabela 9: Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após processos de digestão ácida (n = 3).

Procedimento	Recuperação (%)			
	Cu	Fe	Mn	Zn
1	25,0	12,0	ND	18,0
2	0,0	5,0	ND	11,0
3	10,0	*	*	ND
4	66,0	58,0	45,0	70,0
5	81,0	61,0	57,0	67,0
6	95,0	83,0	67,0	67,0
7	103,0	76,0	69,0	82,0

* não foi medido; ND- Nada detectado

O procedimento 1 apresentou valores de recuperações baixas para os metais Cu, Fe e Zn, enquanto que para o Mn não se obteve recuperação. No procedimento 2, diminui-se a massa de amostra afim de tentar melhorar o processo de digestão, porém as recuperações foram ruins para Fe e Zn, enquanto que para Cu e Mn nada foi detectado. Observou-se que a digestão prolongada (~ 4h 30 min) e o uso de grandes volumes de reagentes (20,0 mL de HNO_3 e 2,0 mL de H_2O_2) foram os motivos dos resultados ruins. O volume final das

diluições nesses procedimentos foi de 25,0 mL devido aos elevados volumes de reagentes utilizados.

Uma nova tentativa de digestão foi avaliada usando frasco fechado e de menor volume para evitar contaminações e/ou perda dos analitos. No procedimento 3, tubos criogênicos (5,0 mL) foram usados contendo 0,5 g de amostra, 3,0 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2 sob aquecimento em banho-maria durante 2 horas a 90°C . As recuperações desse procedimento também não foram promissoras, pois o tubo era pequeno para o volume dos reagentes usados. Mesmo com o tubo fechado o material da digestão efervescia com a adição do peróxido de hidrogênio e ocorria perda de material através da rosca da tampa do tubo. A recuperação foi baixa para Cu (10,0%) e nada foi detectado para o Zn. Desta forma não houve interesse em se medir os metais Fe e Mn no referido digerido. A partir do procedimento 3, o volume final de diluição dos digeridos foram sempre de 10,0 mL, pois os procedimentos utilizaram menores volumes de reagentes.

Para tentar evitar a perda do digerido por efervescência, no procedimento 4, foi reduzido os volumes de reagentes pela metade (1,5 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2). As recuperações para Cu, Fe, Mn e Zn foram 66,0%, 58,0%, 45,0% e 70,0% respectivamente, melhores que no procedimento 3, mas ainda não foram adequadas, pois observava-se partículas das amostras não digeridas aderidas na tampa do tubo e ainda perdas do digerido através da tampa.

Em seguida testou-se o procedimento com tubos maiores (Falcon, 50,0 mL) para evitar a perda de material durante a efervescência. Como o tubo Falcon era maior, aumentou-se a massa das amostras para 1,25 g a fim de aumentar a concentração dos elementos analisados e os volumes de HNO_3 e H_2O_2 para 5,0 mL e 2,0 mL, respectivamente. A digestão ocorreu em banho-maria a aproximadamente 90°C por 2 h. O digerido apresentou uma aparência mais límpida e aumento dos valores de recuperação em relação aos procedimentos anteriores, principalmente para Cu que foi de 81%, porém para os demais metais ainda não foram satisfatórios.

Para tentar minimizar ainda mais as perdas de amostras por efervescência e melhorar a digestão foi feito o procedimento 6 (0,5 g, 3,0 mL de HNO_3 e 1,5 mL de H_2O_2) diminuindo a massa e os volumes de reagentes em comparação com o procedimento 5. As recuperações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn para o procedimento 6 foram de 95,0%, 83,0%, 67,0% e 67,0%, respectivamente indicando melhora na liberação de Cu e Fe da matéria orgânica, porém não sendo adequado para Mn e Zn.

Por fim foi feito o procedimento 7 (0,1 g, 3,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂) diminuindo ainda mais a massa de amostra na tentativa de obter uma digestão completa, sem sobrar partículas nas paredes do tubo e diminuindo o volume de peróxido de hidrogênio o qual gerava a efervescência do meio. As recuperações foram de 103,0%, 76,0%, 69,0% e 82,0% para os metais Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, indicando boa recuperação para Cu e Zn.

Avaliando-se os sete procedimentos, observou-se que nenhum deles foi satisfatório, pois a baixa temperatura proporcionada pelo banho (ponto de ebulição da água) não era suficiente para ocorrer uma completa digestão das amostras, além disso mesmo diminuindo o volume do peróxido de hidrogênio sempre ocorria perda das amostras por efervescência. Para resolver o problema da temperatura insuficiente empregou-se na sequência um bloco digestor onde a temperatura poderia ser aumentada e controlada.

No procedimento utilizando o bloco digestor, inicialmente pesou-se 0,3 g de amostra, 2,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂ em tubos de vidro (10,0 mL) com tampa plástica (procedimento 8). Foi feito uma rampa de aquecimento (90,0°C, 100,0°C e 130,0°C) para que a temperatura não subisse muito rapidamente e para evitar efervescência brusca do meio e perdas de amostra. Visualmente, a digestão foi completa, porém com a adição do peróxido de hidrogênio ocorria a efervescia e atingia a tampa do tubo de ensaio. Os resultados desse procedimento não foram confiáveis, pois os valores das concentrações foram maiores do que o esperado indicando contaminação, principalmente para o Zn (Tabela 10).

Tabela 10: Recuperação de íons metálicos (1,0 mg L⁻¹) em testículo bovino após aplicação do procedimento 8 (n = 3).

Procedimento 8	
Metal	Recuperação (%)
Cu	125,0
Fe	119,5
Mn	137,0
Zn	150,0

Como toda a vidraria era previamente descontaminada, suspeitou-se da possibilidade das tampas dos tubos de ensaio serem a fonte de contaminação durante o

processo de digestão. Desta forma, substituíram-se as tampas plásticas dos tubos de ensaio por ponteiras de micropipetas durante o processo de digestão das amostras. As ponteiras possuem diâmetro de 1,0 cm que se encaixaram perfeitamente na boca do tubo de vidro e seu pequeno orifício na ponta permitiu a saída de vapor do ácido durante a digestão. Foram feitos testes de contaminação para soluções “brancos” no intuito de verificar se as tampas estariam contaminando as amostras durante a digestão. Foram testados apenas para o Zn, pois este apresentou maior valor de recuperação em relação aos outros metais indicando que estaria sofrendo maior contaminação. Os procedimentos usando tampas e ponteiras foram feitos para o Zn e estão representados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados das concentrações de Zn oriundos dos brancos digeridos usando tubos com as tampas próprias e com ponteiras de micropipetas.

	Brancos*	Concentração (mg L ⁻¹)
Tubo com ponteira	1	< LD
	2	< LD
Tubo com tampa	1	> FL
	2	1,59

*água ultrapura, HNO₃ e H₂O₂;

FL – Faixa linear de trabalho para Zn (0,1 – 0,5 mg/L); LD – Limite de detecção.

Observando a Tabela 11 verificou-se que os valores de Zn dos tubos que utilizavam as próprias tampas foram muito altos, chegando a ultrapassar a faixa linear de trabalho do Zn, indicando que as tampas contaminavam as amostras durante a digestão. Já para os tubos tampados com ponteiras de micropipetas não ocorreu a detecção de Zn nos digeridos. O teste das tampas foi feito apenas com o metal Zn, pois foi o metal que apresentou a maior contaminação nas amostras.

Após resolver o problema de contaminação, avaliaram-se dois novos procedimentos utilizando o bloco digestor, usando ponteiras de micropipetas como tampa e somente ácido nítrico para realização da digestão. No procedimento 9 foram utilizados 0,3 g de massa de amostra de testículo bovino e 2,0 mL de HNO₃ com a mesma rampa de aquecimento (90°C, 100°C e 130°C), onde a mesma permaneceu 5 minutos em cada temperatura. No procedimento 10, variou-se apenas a massa da amostra para 0,5 g para verificar se o procedimento era viável com uma massa maior. Com o controle adequado de temperatura foi possível remover o peróxido de hidrogênio do procedimento, sendo o ácido nítrico

suficiente para digerir o tecido biológico. Os dois procedimentos (9 e 10) apresentaram recuperações excelentes para os metais Cu, Fe, Mn e Zn (Tabela 12).

Tabela 12: Recuperação de espécies metálicas (1,0 mg L⁻¹) em testículo bovino após aplicação dos procedimentos 9 e 10, (n = 3).

Metal	Recuperação (%)	
	Procedimento 9	Procedimento 10
Cu	107,4	105,2
Fe	100,6	105,3
Mn	108,0	102,2
Zn	100,5	97,0

Portanto, como os procedimentos 9 e 10 apresentaram-se eficientes, o procedimento escolhido para a validação do método de preparo de amostras para a digestão ácida foi o procedimento 9, que necessita de menor massa de amostra, pois alguns tecidos biológicos coletados eram insuficientes para as análises em triplicata.

Comparando o procedimento 9 com alguns métodos descritos na literatura, sobre a digestão ácida, pode-se observar que o procedimento proposto nesse trabalho apresentou boa recuperação para todos os metais estudados, com tempo de digestão relativamente curto (~1h 30 min), além de ser um procedimento mais simples, pois necessitou apenas da adição de um pequeno volume (2,0 mL) de HNO₃ quando comparado à outras metodologias, além de usar equipamento de baixo custo para a digestão.

Nunes et al. (2011) determinaram Ca, Cu, Fe e Mg em carnes frescas utilizando 500 mg de amostra, 5,0 mL de HNO₃ concentrado e aquecimento em bloco digestor por 90°C durante 1 h. Após, o digerido resfriado, adicionou-se na sequência 2,0 mL H₂O₂ e aqueceu-se a 90°C por 1 h para finalizar a digestão. Verificaram-se digestão incompleta, necessitando de uma melhor otimização do método.

Cerulli et al. (2006) determinaram Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de rins neoplásicos utilizando massas que variaram de 0,3 a 3,0 g. As amostras foram deixadas em contato com HNO₃ concentrado por uma noite, após adicionaram-se H₂O₂ e completaram a digestão em forno micro-ondas (MW). Os valores de Cd, Cu, Pb e Zn encontrados nos tecidos normais foram mais elevados em relação ao tecido com carcinoma. Nos tecidos neoplásicos, a concentração de Cd e Pb foram muito baixa.

Tizioto et al. (2014) determinaram Ca e K em carne bovina utilizando os seguintes parâmetros: 0,1 g de amostra, 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de água ultra pura. A digestão foi realizada em reservatório fechado de forno micro-ondas utilizando uma rampa de aquecimento: (1) 10 min com temperatura máxima de 120°C, (2) 15 min com temperatura máxima de 170°C, (3) 170°C durante 35 min. As concentrações médias encontradas para Ca e K foram de 164,6 e 1211,2 mg kg⁻¹, respectivamente.

5.2 Otimização da solubilização alcalina do tecido animal

Após otimizar o método da digestão ácida, foram avaliadas também solubilizações alcalinas com TMAH, sempre com o objetivo de acelerar a rotina de análises químicas. No procedimento 1 foram utilizados 0,5 g de amostra (tubos Falcon 50,0 mL) e 1,0 mL de TMAH (25% m/v) a temperatura ambiente por 2 h. As recuperações desse procedimento não foram satisfatórias, sendo de 72,0% para o Cu e de 80,0%, para o Zn, Fe e Mn nem chegaram a ser medidos devido a observação visual de partículas das amostras em suspensão no material solubilizado (Tabela 13).

No procedimento 2 foram utilizados 0,5 g de amostra (tubos Falcon 50,0 mL), 1,0 mL de TMAH (25% m/v) e mais 0,5 mL de H₂O para aumentar o contato da solução com a amostra. Neste caso, deixou-se os tubos em banho-maria a 50°C por 1 h para acelerar a solubilização. As recuperações desse procedimento também não foram satisfatórias, sendo de 74,0% para o Cu, de 76,0% para o Fe, de 63,0% para o Mn e de 69,0% para o Zn (Tabela 13).

Um terceiro procedimento de solubilização alcalina foi testado empregando-se o bloco digestor e tubos de vidros (10,0 mL). Massas de 0,3 g de amostras foram colocadas em contato com 1,0 mL de solução de TMAH (25% m/v), 0,5 mL de H₂O e aquecimento em bloco digestor por 1 h a 60°C. Observou-se que a solubilização alcalina conseguiu eliminar a gordura dos tecidos biológicos, pois não foi observada formação de gotículas de gordura após o resfriamento a temperatura ambiente. Com a temperatura controlada do bloco digestor a solubilização foi completa.

A temperatura foi mantida a 60°C para evitar a perda dos analitos e também para acelerar a solubilização em relação a temperatura ambiente (SILVA et al., 2003). A utilização da água juntamente com o TMAH, ajudou na hidratação do meio permitindo que o reagente penetrasse mais facilmente na matriz, liberando as espécies metálicas

(ARANHA et al., 2016). As recuperações desse procedimento foram satisfatórias e os valores das recuperações estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Recuperação de íons metálicos ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em testículo bovino após aplicação dos procedimentos 1, 2 e 3 com solubilização alcalina ($n = 3$).

Metal	Recuperação (%)		
	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Cu	72,0	74,0	101,0
Fe	*	76,0	102,0
Mn	*	63,0	101,0
Zn	80,0	69,0	99,0

* Não foi medido

Portanto, o procedimento utilizado para a validação do método de preparo de amostras por solubilização alcalina foi o procedimento 3, o qual apresentou excelentes recuperações ficando dentro da faixa de recuperação adequada que é de 80 a 110% (AOAC, 2012).

Comparando o procedimento 3 com alguns métodos descritos na literatura, sobre solubilização alcalina utilizando TMAH, pode-se observar que o procedimento proposto nesse trabalho apresentou boa recuperação para todos os metais estudados, com tempo de solubilização relativamente curto ($\sim 1 \text{ h}$), além de ser um procedimento mais simples, comparado à outras metodologias e por usar equipamento para aquecimento de baixo custo.

Nunes et al. (2013) determinaram Fe, Mg, Mn, P e Zn em amostras de carnes utilizando 1 g de amostra de carne com 1,25 mL de TMAH (25% m/v). A solubilização alcalina ocorreu a temperatura ambiente, entre 2 a 3 h. Os resultados encontrados para as concentrações das espécies estudadas indicaram ampla variação dependendo do tipo de amostra.

Batista et al. (2009) determinaram elementos traços em tecidos biológicos utilizando 0,75 g de amostra com 1,0 mL de TMAH (50% v/v) à temperatura ambiente durante 12 h em um homogeneizador rotacional. O método de solubilização foi adequado para as determinações das espécies metálicas de interesse.

Ribeiro et al. (2005) determinaram Co em amostras biológicas utilizando 0,250 g de amostra e 2,0 mL de TMAH (25% m/v), no entanto, não especificaram o tempo para a solubilização. O método mostrou-se eficiente, rápido e simples.

Comparando-se os dois métodos otimizados e propostos nesse trabalho, a digestão ácida e a solubilização alcalina, pode-se comprovar que a solubilização alcalina necessita de menor volume de reagente (1,0 mL de TMAH, 25% m/v), menor temperatura (60°C) e menor tempo (1 h), o que torna muito vantajosa a utilização do TMAH no preparo de tecidos biológicos.

5.3 Validação

5.3.1 Curvas analíticas para o método de preparo de amostra por solubilização alcalina

Curvas analíticas para os metais Cu, Fe, Mn e Zn com e sem TMAH foram realizadas a fim de verificar se o reagente poderia interferir na quantificação dos metais, devido a sua viscosidade durante a aspiração pelo capilar do equipamento de absorção atômica em chama.

As curvas para cada metal na ausência e presença do TMAH em meio aquoso estão representadas na Figura 2.

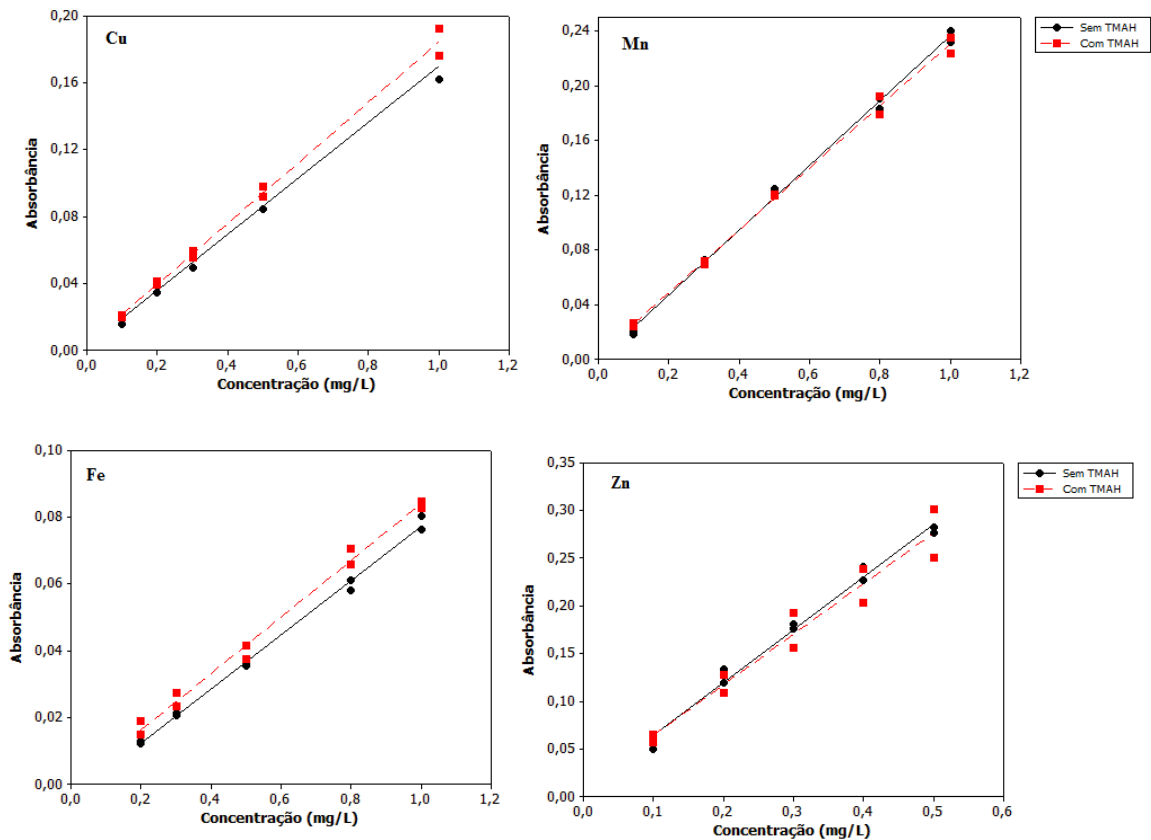


Figura 2: Curvas analíticas obtidas para a determinação de Cu, Mn, Fe e Zn empregando calibração por padrão externo (●) e por adição com TMAH (■).

Pode-se verificar na Figura 2 que as curvas analíticas na presença e na ausência de TMAH foram similares, para as faixas de concentrações estudadas de cada elemento. Para todos os metais avaliados observou-se que as curvas analíticas apresentaram inclinações similares, indicando que não há interferência proveniente da viscosidade do TMAH. Para comprovar essa semelhança, foram feitos testes estatísticos (regressão linear) que se encontram apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Regressão Linear das curvas analíticas na ausência e presença de TMAH para Cu, Mn, Fe e Zn.

Resultados da Regressão						
Metal	Calibração	$F_{regressão}$	p	$F_{faj.}$	P	Equação da Reta
Cu	Meio aquoso	1256,21	0,000	0,17	0,914	Abs= 0,00238 + 0,168 * C
	Adição de TMAH	1616,68	0,000	0,05	0,982	Abs= 0,00317 + 0,181 * C
Fe	Meio aquoso	2160,50	0,000	0,93	0,491	Abs= -0,00401+0,0813 *C
	Adição de TMAH	1027,70	0,000	0,56	0,663	Abs= -0,00068+0,0847 *C
Mn	Meio aquoso	2834,21	0,000	2,61	0,164	Abs= -0,00113 + 0,238 *C
	Adição de TMAH	2300,31	0,000	0,27	0,844	Abs= 0,00317 + 0,228 * C
Zn	Meio aquoso	745,29	0,000	1,97	0,236	Abs= 0,00848 + 0,555 * C
	Adição de TMAH	157,19	0,000	0,04	0,989	Abs= 0,0103 + 0,533 * C

Abs: Absorbância; C: Concentração

As curvas analíticas para os quatros metais apresentaram os valores de $F_{regressão}$ maiores que o valor de $F_{crítico(0,05; 1,8)}= 5,32$, e os valores de $p < 0,05$, portanto, a regressão linear foi significativa no nível de confiança de 95%. No mesmo nível de confiança, os modelos não apresentaram falta de ajuste, pois os valores de F_{faj} ficaram menores que o valor de $F_{crítico(0,05; 3,5)}=5,41$ e os valores de $p > 0,05$, portanto, o modelo linear é aceito. Para a curva analítica com adição de TMAH todos os valores de $F_{regressão}$ ficaram maiores que o valor de $F_{crítico(0,05; 1,8)}= 5,32$, e os valores de $p < 0,05$, portanto, a regressão linear é significativa também no nível de confiança de 95%. No mesmo nível de confiança, os modelos não apresentaram falta de ajuste, pois os valores de F_{faj} ficaram menores que o valor de $F_{crítico(0,05; 3,5)}=5,41$ e os valores de $p > 0,05$, portanto, o modelo linear é aceito.

A fim de verificar as semelhanças das curvas analíticas, foram calculados os intervalos de confiança (I.C.) para os coeficientes angulares de cada curva, em um nível de confiança de 95%, de acordo com a seguinte Equação 7 (NETO et al., 2010):

$$I. C. = b_1 \pm t(n - 2) * EP$$

(Equação 7)

Onde b é o coeficiente angular; t vem da distribuição- t com $n-2$ graus de liberdade e EP é o erro padrão do coeficiente angular.

Os resultados obtidos dos coeficientes angulares e seus intervalos de confiança encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados dos coeficientes angulares e seus intervalos de confiança.

Metal	Padrão Externo		Padrão Externo com TMAH	
	Coeficiente Angular	Intervalo de Confiança	Coeficiente Angular	Intervalo de Confiança
Cu	0,168 ± 0,005	0,157 a 0,178	0,181 ± 0,005	0,171 a 0,192
Fe	0,0813 ± 0,002	0,0772 a 0,0853	0,0846 ± 0,003	0,0786 a 0,0907
Mn	0,238 ± 0,004	0,228 a 0,249	0,228 ± 0,005	0,217 a 0,239
Zn	0,555 ± 0,0203	0,508 a 0,602	0,533 ± 0,0981	0,435 a 0,631

Observando os intervalos de confiança para cada metal, nota-se que as inclinações das curvas analíticas podem ser consideradas similares, pois os intervalos de confiança se sobrepõem. Também foram calculadas as razões dos coeficientes angulares dos dois métodos de calibração nas faixas de trabalho estudadas. Para a faixa de trabalho do Cu, Mn, Fe e Zn a razão dos coeficientes angulares foi 1,08, 1,05, 1,04, 1,04, respectivamente. Considerando os testes realizados, pode ser afirmado que a viscosidade do TMAH não interferiu nas medidas para determinação dos metais de interesse nas amostras de tecido animal utilizando a FAAS e que com as faixas de trabalho estudadas, qualquer um dos métodos de calibração analítica (métodos de padrão externo em meio aquoso e com adição de TMAH) podem ser utilizadas para quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal. Portanto, escolheu-se a curva analítica de padrão externo em meio aquoso para a quantificação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal, por se tratar de um método mais rápido e simples no preparo das soluções padrão e também por reduzir a utilização de reagentes.

Silva et al., (2003) testaram curvas de calibração em solução aquosa em meio ácido com HNO₃ e em meio alcalino com TMAH, onde as inclinações das curvas de calibração não diferenciam significativamente.

Já Souza et al., (2013) testaram curvas analíticas preparadas com HNO₃ e com TMAH, o teste indicou que existe diferença significativa, portanto usaram curvas analíticas preparadas com TMAH em suas determinações.

5.3.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade da faixa de concentração estudada, foram construídas curvas analíticas de padrão externo para cada metal na faixa de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ para Cu e Mn, de 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ para Fe e 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ para Zn. Foi aplicada aos resultados obtidos a técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança realizada em triplicata.

Metal	Parâmetros da Regressão Linear					
	$F_{regressão}$	valor de p	$F_{falta\ de\ ajuste}$	valor de p	R	$R^2(\%)$
Cu	2143,96	0,000	0,20	0,894	0,997	99,4
Fe	2158,59	0,000	1,27	0,336	0,997	99,4
Mn	847,67	0,000	0,34	0,800	0,992	98,5
Zn	917,54	0,000	2,06	0,170	0,993	98,6

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 16, verificou-se que o modelo linear foi significativo para as faixas de concentração estudadas, pois os valores observados de $F_{regressão}$ foram maiores do que o valor do $F_{crítico(0,05; 1, 13)} = 4,67$ e os valores de p foram menores do que 0,05 em um nível de confiança de 95%. No mesmo nível de confiança, o modelo linear para as faixas de concentração estudadas não apresentou falta de ajuste, pois os valores observados de $F_{falta\ de\ ajuste}$ foram menores do que o valor do $F_{crítico(0,05; 3, 10)} = 3,71$ e os valores de p foram maiores do que 0,05.

As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação (r) maiores do que o limite recomendado pela ANVISA (2003) ($r > 0,99$). Para o coeficiente de determinação (R^2) que é a variabilidade dos dados experimentais explicados pelo modelo linear gerado (FREIRE et al., 1999), os valores de R^2 para o Cu e Fe foram de 99,4% indicando que apenas 0,6% da variação nos dados experimentais são explicados pelos resíduos. Para o Mn foi de 98,5% indicando que 1,5% da variação nos dados experimentais são explicados

pelos resíduos e para o Zn 98,6% indicando que 1,4% da variação nos dados experimentais são explicados pelos resíduos.

Para verificar a significância dos coeficientes da curva analítica (linear e angular) e avaliar se passam pela origem, foi aplicado um *teste-t* no nível de 95% de confiança. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados do *teste-t* no nível de 95% de confiança para os metais Cu, Fe, Mn e Zn.

Metal	<i>t</i>calculado linear	<i>P</i>	<i>t</i>calculado angular	<i>p</i>
Cu	0,88	0,392	46,30	0,000
Fe	4,14	0,001	46,46	0,000
Mn	0,01	0,989	29,11	0,000
Zn	1,63	0,127	30,29	0,000

$$t_{\text{crítico}}(0,025; 13) = 2,16$$

Os resultados apresentados na Tabela 17 indicaram que para o metal Cu, Mn e Zn os coeficientes lineares não foram significativos com $p > 0,05$, indicando que a curva passa pela origem, já que para o Fe o coeficiente linear foi significativo com $p < 0,05$. Os coeficientes angulares foram significativos para todos os metais com $p < 0,05$. Assim, a análise do *teste-t* indicou que a curva analítica de padrão externo para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn podem ser utilizadas, pois apresentaram linearidade na faixa de concentração estudada.

5.3.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os valores dos limites (LD e LQ) foram utilizados para verificar a sensibilidade dos métodos de preparação de amostra do tecido animal para determinação de Cu, Mn, Fe e Zn por FAAS.

Para determinar os valores de LD e de LQ para os métodos desenvolvidos, foram calculados os desvios padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco para os metais (Cu, Fe, Mn e Zn) e foi utilizado o valor da inclinação da curva analítica de cada metal, segundo as Equações 1 e 2 do item 4.4.3. Os limites de detecção e quantificação obtidos estão representados na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados dos valores de LD e LQ (mg kg^{-1}) dos dois métodos propostos para determinações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por F AAS.

Metal	Digestão ácida		Solubilização alcalina	
	LD	LQ	LD	LQ
Cu	0,1	0,34	0,12	0,41
Fe	1,02	3,4	0,74	2,5
Mn	0,16	0,53	0,16	0,54
Zn	0,67	2,2	0,23	0,77

Os valores de LD e de LQ para a digestão ácida ficaram superiores aos determinados para a solubilização alcalina para Fe e Zn (Tabela 18). Matusiewicz e Golik (2004) descreveram em seu trabalho que os pequenos volumes de TMAH, menor manuseio e pureza, proporcionaram “brancos” baixos, diminuindo assim os valores do limite de detecção dos analitos nas amostras.

Os resultados demonstraram que o método de preparo de amostras por solubilização alcalina apresentou uma maior sensibilidade em relação ao método de digestão ácida. Outras vantagens da solubilização alcalina foram os fatos de utilizar menores quantidades de reagentes do que a digestão ácida, menor tempo de digestão e menor temperatura, diminuindo assim o risco de contaminação das amostras.

Nunes et al., (2011), descreveram LD para Fe de $16,0 \mu\text{g g}^{-1}$ usando o TMAH e de $18,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para digestão ácida de carnes frescas e processadas.

5.3.4 Precisão

Para verificar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos neste trabalho, foi realizado o estudo de precisão avaliada através da repetitividade, no mesmo dia e da precisão intermediária, realizada em três dias diferentes. Foi aplicado o *teste-F* de comparação de variâncias no intuito de avaliar se existem diferenças significativas entre as duas variâncias amostrais dos métodos analisados.

5.3.4.1 Repetitividade

Para a repetitividade foram preparadas e realizadas medidas em triplicata da

amostra no mesmo dia para todos os metais nos dois métodos de preparo de amostra. A concentração de Cu e Mn na amostra ficou igual e abaixo do LQ, portanto a amostra foi fortificada com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para os dois metais. Para analisar a repetitividade dos métodos analisados, foi calculado o RSD (%) para todos os metais de interesse para verificar se estes se encontram dentro do limite do coeficiente de variação estabelecido pela AOAC (2012). Os resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19: Valores da média, intervalos de confianças e RSD para a repetitividade na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de tecido animal.

Metal	Digestão ácida		Solubilização alcalina		
	Média (mg kg^{-1})	RSD (%)	Média (mg kg^{-1})	RSD (%)	RSD (%) recomendada
Fe	$11,6 \pm 0,7$	6,5	$10,2 \pm 0,4$	4,3	7,3
Zn	$15,3 \pm 0,4$	2,8	$13,9 \pm 0,6$	4,5	7,3
Fortificação com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$					
Cu	$16,7 \pm 0,9$	5,7	$16,4 \pm 0,7$	4,2	7,3
Mn	$15,5 \pm 0,5$	3,2	$14,9 \pm 0,5$	3,1	7,3

Observando os resultados apresentados na Tabela 19, os valores encontrados para RSD (%) foram inferiores ao valor recomendado pela AOAC (2012) na faixa de concentração investigada considerando os dois métodos de preparo de amostra apropriados.

Comparando os resultados de RSD (%) obtidos através dos estudos de repetitividade, verificou-se que o método de solubilização alcalina proporcionou os menores valores de RSD (%) para todos os metais avaliados em relação ao procedimento de digestão ácida com exceção do metal Zn.

5.3.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi obtida através de análises realizadas em três dias diferentes, sendo as amostras realizadas em triplicata para cada método. As concentrações de Cu e Mn na amostra de tecido animal ficaram igual e abaixo do valor do LQ, então foi necessário fazer uma fortificação da amostra, com uma concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Foi

calculado o RSD (%) para verificar se os valores encontrados estão dentro do limite proposto pela AOAC (2012). Os resultados obtidos para precisão intermediária para os dois métodos encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados da precisão intermediária dos métodos propostos calculados em três dias consecutivos: médias das concentrações, RSD (%) para Cu, Fe, Mn e Zn e valor de Horrat.

Metal	Digestão ácida			Solubilização alcalina		
	Média (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Horrat	Média (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Horrat
Fe	10,4 ± 0,6	6,3	1,02	10,0 ± 0,5	5,6	0,48
Zn	12,5 ± 0,9	7,0	1,28	12,6 ± 0,5	4,4	0,64

Fortificação com 0,5 mg L ⁻¹						
Metal	Média (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Horrat	Média (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Horrat
Cu	17,41 ± 1,17	6,7	0,73	16,8 ± 0,56	3,3	0,63
Mn	16,13 ± 0,88	5,5	1,02	16,09 ± 0,95	5,9	1,05

Comparando os resultados obtidos pela precisão intermediária verificou-se que os valores de RSD (%) obtidos pelo método de solubilização alcalina foram menores para os metais, exceto para Mn, em relação dos da digestão ácida.

Os valores do RSD calculado para a precisão intermediária foram adequados, pois permaneceram abaixo do limite proposto pela AOAC (2012) que é de 15,00 %.

Os valores de Horrat calculados para os métodos de solubilização alcalina e digestão ácida dos tecidos foram adequados, pois o limite aceitável não deve ser maior do que 1,3 segundo González et al. (2010) e de 2,0 segundo Valdersnes et al. (2016). Portanto, os dois métodos apresentam precisão adequada para a determinação dos metais de interesse em tecidos biológico.

O teste estatístico aplicado nesse trabalho (*teste-F*) avaliou se existem diferenças significativas entre as variâncias amostrais dos dois métodos de preparo de amostra, juntamente com os intervalos de confiança para a razão entre as variâncias (CASSIANO et al., 2009). Os dados obtidos para o *teste-F* são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Dados obtidos do *teste-F* para precisão dos métodos analisados para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn na amostra de tecido animal.

<i>Teste-F</i>			
Metal	<i>F</i> calculado	valor de <i>p</i>	Intervalos de confiança para a razão das variâncias
Cu	1,40	0,648	(0,315 – 6,192)
Fe	2,48	0,221	(0,559 – 10,978)
Mn	1,65	0,492	(0,373 – 7,334)
Zn	1,53	0,559	(0,346 – 6,803)

A análise do *teste-F* indicou-se que não existem diferenças significativas entre a precisão do método por solubilização alcalina em relação ao método por digestão ácida, pois os valores de *F* calculado foram inferiores ao valor de *F* crítico ($0,05,8,8$) = 3,44, com $p > 0,05$. Para confirmar a precisão dos métodos, foram construídos intervalos de confiança (I.C.) para a razão das variâncias de cada um dos metais analisados, no nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos de I.C. para Cu, Fe, Mn e Zn apresentaram limites inferiores a 1,0, confirmando que não existem diferenças significativas de precisão entre os métodos estudados (WERNIMONT, 1985).

Desta forma pode-se afirmar que os dois métodos de preparo de amostra apresentam precisão adequada para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por FAAS e que não existem diferenças significativas entre eles.

5.3.5 Exatidão

Para avaliar a exatidão dos métodos foram realizados estudos por meio de testes de recuperação por adição de padrão em dois níveis de concentração para cada metal de interesse, em triplicata, de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ para Cu, Fe e Mn e de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ para Zn, pois a faixa de concentração da curva analítica para Zn é menor do que os outros metais. Também foi feito teste estatístico como o *teste-t* para verificar se existem diferenças significativas entre as médias amostrais dos métodos analisados no nível de 95% de confiança.

A porcentagem de recuperação dos metais de interesse na amostra de tecido animal utilizando as duas metodologias nas concentrações utilizadas (0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹) estão dentro da faixa proposta pela AOAC (2012) que é de 80 – 110%, no nível de concentração estudada, indicando que os métodos analisados neste trabalho para

determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido animal apresentam exatidão adequada. Os resultados do teste de recuperação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em amostra de testículo bovino encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados da média da concentração recuperada e sua porcentagem para Cu, Fe, Mn e Zn na amostra de testículo bovino no nível de 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹.

Metal	Digestão ácida			Solubilização alcalina	
	Concentração Adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração Determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração Determinada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Cu	0,50	0,53 ± 0,06	105,5	0,50 ± 0,005	100,8
	1,00	1,01 ± 0,01	100,7	0,93 ± 0,004	92,8
Fe	0,50	0,52 ± 0,04	103,3	0,49 ± 0,04	98,7
	1,00	0,96 ± 0,08	96,2	1,05 ± 0,2	104,8
Mn	0,50	0,47 ± 0,008	94,9	0,52 ± 0,02	103,7
	1,00	0,95 ± 0,004	95,4	1,02 ± 0,07	101,9
Zn	0,25	0,23 ± 0,06	92,0	0,24 ± 0,03	96,0
	0,50	0,45 ± 0,02	89,6	0,48 ± 0,04	95,7

A porcentagem de recuperação, no nível de 0,25 mg L⁻¹, para Zn foi melhor na solubilização alcalina (96,0%) do que na digestão ácida (92,0%). No nível de 0,5 mg L⁻¹ de dopagem, a recuperação foi sempre mais próxima de 100% nos processos de solubilização alcalina (95,7 a 103,7%) em relação a digestão ácida (89,6 a 105,5%). E no nível de 1,0 mg L⁻¹, a solubilização alcalina proporcionou recuperações entre 92,8 a 104,8% e a digestão ácida entre 95,4 a 100,7%.

A exatidão também foi avaliada por meio de comparação entre os métodos analisados (digestão ácida e solubilização alcalina) aplicando *teste-t* para verificar se existem diferenças significativas entre as médias amostrais no nível de 95% de confiança. Os resultados do *teste-t* estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados da avaliação de exatidão pela aplicação do *teste-t* para os métodos na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn de tecido animal por FAAS

<i>Teste-t</i>			
Metal	<i>t</i> calculado	valor de <i>p</i>	<i>Intervalos de confiança para a diferença das médias</i>
Cu	1,92	0,074	(-0,1865 – 0,0098)
Fe	0,90	0,384	(-3,64 – 1,49)
Mn	1,75	0,100	(-0,0053 – 0,0546)
Zn	0,24	0,813	(-0,952 – 1,194)

A análise do *teste-t* indicou que não existem diferenças significativas entre as médias amostrais de Cu, Fe, Mn e Zn pelos métodos analisados (solubilização alcalina e digestão ácida), pois os valores de *t*calculado foram inferiores ao valor de *t*crítico(0,05,16) = 2,120, com $p > 0,05$. Para comprovar esses resultados foram construídos intervalos de confiança para a diferença das médias para cada metal de interesse. Pode-se verificar na Tabela 23 que os intervalos de confiança incluíram o zero e confirmaram que não existem diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostra avaliados.

Desta forma, pode-se afirmar que os dois métodos de preparo de amostra apresentam exatidão adequada para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por FAAS e que não foram afetados de forma significativa por erros sistemáticos.

Como visto nos resultados obtidos pelos parâmetros de validação, tanto o método de digestão ácida quanto o de solubilização alcalina podem ser utilizados para a determinação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal por FAAS. Qualquer um dos dois procedimentos poderá ser utilizado na digestão dos tecidos biológicos, no entanto, para a continuação dos estudos deste trabalho optou-se pela solubilização alcalina, pois a maioria dos resultados obtidos durante a validação sempre indicaram um desvio menor para os valores de LD e LQ, menores RSD (%) na precisão e maiores recuperações na exatidão. Também levou-se em conta o menor tempo e volume de reagente utilizado, além da observação que com o uso de TMAH foi eliminada completamente a gordura do tecido animal que pode alterar a viscosidade do digerido durante a aspiração da amostra pelo amostrador do equipamento de absorção atômica em chama.

5.4 Determinação das espécies metálicas em amostras de tecido animal canino

Após a otimização e validação da metodologia analítica de solubilização alcalina para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal (procedimento 3), aplicou-se o método em diferentes tecidos biológicos (glândula mamária, pâncreas, pele e testículo) em espécies caninas com e sem neoplasias (Tabelas 24 a 27).

Tabela 24: Concentração (mg kg^{-1}) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de glândula mamária canina com e sem neoplasias.

Amostra	Cu		Fe		Mn		Zn	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	Neoplasia	neoplasia	Neoplasia	Neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia
M1	$0,63 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,03$	$57,4 \pm 4,0$	$129,0 \pm 5,0$	$0,5 \pm 0,02$	>LD	$33,0 \pm 2,0$	$2,5 \pm 0,15$
M2	$0,6 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,02$	$185,0 \pm 12,0$	$186,1 \pm 7,5$	ND	ND	$10,4 \pm 0,6$	$6,6 \pm 0,4$
M3	$6,7 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	$121,5 \pm 0,25$	$171,0 \pm 8,0$	ND	ND	$9,6 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,2$
M4	$0,90 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,07$	$88,3 \pm 4,0$	$57,0 \pm 1,5$	ND	ND	$0,7 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,07$
M5	$0,2 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,002$	$111,1 \pm 4,0$	$36,2 \pm 0,3$	ND	ND	$6,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,04$
M6	$8,8 \pm 0,09$	$2,3 \pm 0,15$	$32,5 \pm 0,2$	$137,0 \pm 8,5$	ND	$0,2 \pm 0,02$	$9,0 \pm 0,35$	$9,0 \pm 0,65$
M7	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$197,0 \pm 13,0$	$266,0 \pm 16,0$	ND	ND	$5,0 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,5$
M8	$2,8 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,2$	$12,4 \pm 1,0$	$117,0 \pm 11,0$	>LD	$0,4 \pm 0,03$	$1,2 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,5$
M9	$3,5 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,2$	$139,1 \pm 5,0$	$72,5 \pm 6,0$	>LD	>LD	$7,0 \pm 0,5$	$7,8 \pm 0,5$
M10	$1,2 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,02$	$91,5 \pm 7,5$	$79,0 \pm 6,0$	$0,2 \pm 0,0$	>LD	$9,5 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,5$
M11	$0,6 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,03$	$103,0 \pm 3,0$	$138,0 \pm 2,0$	$0,2 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,02$	$6,8 \pm 0,3$	$9,0 \pm 0,01$

Tabela 25: Concentração (mg kg^{-1}) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de pâncreas canino com e sem neoplasias.

Amostra	Cu		Fe		Mn		Zn	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	Neoplasia	neoplasia	Neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia
PA1	$1,7 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$	$79,1 \pm 1,0$	$48,5 \pm 0,7$	ND	< LD	$8,8 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,2$
PA2	$4,3 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,5$	$142,6 \pm 3,5$	$111,5 \pm 2,4$	$0,2 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,04$	$19,5 \pm 0,9$
PA3	$1,6 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,06$	$111,0 \pm 4,5$	$49,9 \pm 2,5$	$1,2 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,02$	$20,5 \pm 0,3$	$33,4 \pm 3,0$
PA4	$1,7 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,08$	$74,1 \pm 3,0$	$81,4 \pm 2,0$	$1,3 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,05$	$7,3 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,5$

ND: Não detectado

LD: Limite de detecção

Tabela 26: Concentração (mg kg^{-1}) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de pele canino com e sem neoplasias.

Amostra	Cu		Fe		Mn		Zn	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	neoplasia	neoplasia	Neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia	neoplasia
P1	$0,7 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,02$	$10,8 \pm 0,6$	$98,5 \pm 2,5$	< LD	ND	$12,0 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,1$
P2	$0,9 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,08$	$36,1 \pm 3,0$	$50,0 \pm 4,0$	ND	ND	$3,2 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$
P3	$0,3 \pm 0,00$	$2,2 \pm 0,1$	$42,1 \pm 1,0$	$45,0 \pm 4,0$	ND	ND	$4,0 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,5$

ND: Não detectado

LD: Limite de detecção

Tabela 27: Concentração (mg kg⁻¹) de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de testículo canino com e sem neoplasias.

Amostra	Cu		Fe		Mn		Zn	
	Com neoplasia	Sem neoplasia	Com Neoplasia	Sem neoplasia	Com neoplasia	Sem neoplasia	Com neoplasia	Sem neoplasia
T1	0,6 ± 0,08	0,82 ± 0,06	35,0 ± 1,0	36,0 ± 1,7	>LD	>LD	17,3 ± 1,6	22,5 ± 0,25
T2	0,75 ± 0,04	0,66 ± 0,03	33,6 ± 2,7	26,5 ± 2,1	ND	ND	17,3 ± 0,4	13,5 ± 0,05
T3	2,2 ± 0,2	1,12 ± 0,06	56,0 ± 4,0	87,0 ± 1,4	>LD	ND	9,0 ± 0,8	2,8 ± 0,2
T4	0,75 ± 0,02	1,08 ± 0,02	24,6 ± 1,0	24,9 ± 1,1	>LD	>LD	28,6 ± 0,6	25,2 ± 0,6
T5	0,96 ± 0,001	0,71 ± 0,02	30,5 ± 0,15	24,1 ± 0,8	0,2 ± 0,02	>LD	13,5 ± 0,1	11,4 ± 0,2
T6	0,65 ± 0,03	0,71 ± 0,01	29,1 ± 0,15	26,8 ± 0,7	0,2 ± 0,00	>LD	11,4 ± 0,3	11,3 ± 0,1
T7	1,09 ± 0,03	0,97 ± 0,04	27,9 ± 1,4	33,3 ± 0,1	>LD	0,43 ± 0,00	16,0 ± 0,8	16,4 ± 1,5
T8	0,85 ± 0,02	0,93 ± 0,03	21,4 ± 0,7	25,4 ± 0,4	0,27 ± 0,02	0,18 ± 0,02	11,6 ± 0,2	10,7 ± 0,3
T9	0,84 ± 0,02	1,1 ± 0,1	35,6 ± 3,0	43,5 ± 0,6	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,04	12,9 ± 0,4	18,3 ± 1,0
T10	0,84 ± 0,01	0,89 ± 0,02	45,6 ± 2,7	23,4 ± 0,8	0,3 ± 0,03	>LD	14,7 ± 0,4	15,5 ± 0,2
T11	0,76 ± 0,03	0,64 ± 0,05	29,0 ± 1,4	22,9 ± 0,24	0,32 ± 0,02	0,4 ± 0,02	12,0 ± 0,45	12,6 ± 0,7
T12	0,99 ± 0,04	0,98 ± 0,02	23,7 ± 1,0	23,0 ± 1,5	>LD	>LD	10,8 ± 0,1	9,0 ± 0,14
T13	1,2 ± 0,05	1,15 ± 0,04	22,5 ± 0,5	25,1 ± 0,4	0,17 ± 0,04	>LD	12,1 ± 0,25	11,6 ± 0,35

ND: Não detectado

LD: Limite de detecção

Foi aplicado teste estatístico (*teste-t* pareado) para a comparação dos teores de Cu, Fe, Mn e Zn entre os tecidos saudáveis e neoplásicos para as amostras de mama, pâncreas, pele e testículo canino, em um nível de 95% de confiança (Tabelas 28 a 31). Também foram construídas intervalos de confiança para a diferença das médias para cada metal analisado.

Tabela 28: Resultados do *teste-t* pareado nas amostras de glândula mamária canina saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.

<i>Teste-t Pareado</i>			
Metal	<i>t</i> calculado	<i>p</i> -valor	<i>Intervalos de confiança para a diferença das médias</i>
Cu	0,52	0,613	(-1,233 – 1,987)
Fe	1,18	0,266	(-65,7 – 20,3)
Zn	1,09	0,302	(-3,33 – 9,6)

Na Tabela 28 os resultados da análise do *teste-t* pareado sugeriram que não existem diferenças significativas nos teores determinados de Cu, Fe e Zn entre as amostras de tecido saudável e com neoplasia nas glândulas mamárias caninas, pois os valores para o *t*calculado apresentaram-se inferiores ao valor de *t*crítico ($0,025; 10$) = 2,228 e com $p > 0,05$. Os intervalos de confiança obtidos incluíram o zero, confirmando que não existem diferenças significativas entre os teores de Cu, Fe e Zn nas amostras de tecido saudável e com neoplasia nas mamas caninas analisadas. Para o metal Mn não foi feito o *teste-t* pareado, pois os valores de Mn não foram detectados ou ficaram abaixo do valor de LD para as amostras de mamas caninas.

Os resultados apresentados na Tabela 29 indicaram na análise do *teste-t* pareado que não há diferenças significativas nos teores metálicos avaliados entre as amostras de tecido saudável e com neoplasia em pâncreas caninos, pois os valores para o *t*calculado de Cu, Fe e Zn apresentaram-se inferiores ao valor de *t*crítico ($0,025; 3$) = 3,182 e com $p > 0,05$. Para Mn o valor de *t*calculado também apresentou-se inferior ao valor de *t*crítico ($0,025; 2$) = 4,303 e com $p > 0,05$. Os intervalos de confiança obtidos incluíram o zero, confirmando que não existem diferenças significativas entre os teores de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de tecido saudável e com neoplasia nos pâncreas caninos analisados.

Tabela 29: Resultados do *teste-t* pareado nas amostras de pâncreas canino saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.

<i>Teste-t Pareado</i>			
Metal	<i>t</i> calculado	<i>p</i> -valor	<i>Intervalos de confiança para a diferença das médias</i>
Cu	0,65	0,560	(-8,14 – 5,36)
Fe	2,06	0,131	(-15,7 – 73,5)
Mn	0,31	0,787	(-1,731 – 1,998)
Zn	1,32	0,279	(-23,96 – 9,91)

Os resultados apresentados na Tabela 30 sugeriram que também não existem diferenças significativas nos teores determinados de Cu, Fe e Zn entre as amostras de tecido saudável e com neoplasia em peles caninas, pois os valores para o *t*calculado apresentaram-se inferiores ao valor de *t*crítico ($0,025; 2$) = 4,303 e com $p > 0,05$. Os intervalos de confiança obtidos incluíram o zero, confirmando que não existem diferenças significativas entre os teores de Cu, Fe e Zn nas amostras de tecido saudável e com neoplasia em peles caninas analisadas. Não foi feito *teste-t* pareado das amostras de pele para o metal Mn, pois os valores de Mn não foram detectados ou ficaram menores do LD.

Tabela 30: Resultados do *teste-t* pareado nas amostras de pele canina saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.

<i>Teste-t Pareado</i>			
Metal	<i>t</i> calculado	<i>p</i> -valor	<i>Intervalos de confiança para a diferença das médias</i>
Cu	0,94	0,445	(-3,448 – 2,208)
Fe	1,31	0,321	(-149,4 – 79,7)
Zn	0,51	0,663	(-10,48 – 13,28)

Conforme pode ser observado na Tabela 31, os resultados indicaram também que não existem diferenças significativas nos teores das amostras de tecido saudável e com neoplasia nos testículos caninos, pois os valores para o *t*calculado para Cu, Fe e Zn apresentaram-se inferiores ao valor de *t*crítico ($0,025; 12$) = 2,179, com $p > 0,05$ e para Mn o valor de *t*calculado apresentou valores inferiores ao valor de *t*crítico ($0,025; 2$) = 4,303 e com

$p > 0,05$. Todos os intervalos de confiança obtidos incluíram o zero, confirmando que não existem diferenças significativas entre os teores de Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras de tecido saudável e com neoplasia nos testículos caninos analisados.

Essa ferramenta estatística não mostrou resultados que permitissem discutir sobre os teores metálicos nas amostras avaliadas, pois esta trabalha com a média geral da concentração dos metais em todos os tecidos, e como a variação das concentrações é grande entre as mesmas, no final os resultados indicam que as amostras não são diferentes. Portanto, decidiu-se utilizar novos cálculos através da análise estatística do *teste-t* por metal e por amostra separadamente e não por média das mesmas.

Tabela 31: Resultados do *teste-t* pareado nas amostras de testículo canino saudável e na presença de neoplasia para os metais, Cu, Fe, Mn e Zn.

<i>Teste-t Pareado</i>			
Metal	<i>t_{calculado}</i>	<i>p-valor</i>	<i>Intervalos de confiança para a diferença das médias</i>
Cu	0,57	0,578	(-0,1558 – 0,2666)
Fe	0,17	0,866	(-7,76 – 6,62)
Mn	0,36	0,751	(-0,2570 – 0,2170)
Zn	0,54	0,596	(-1,476 – 2,461)

Na Tabela 32 estão apresentados os resultados do *teste-t* para as quatro espécies metálicas determinadas nas amostras dos tecidos de glândulas mamárias com seus respectivos intervalos de confiança (IC).

Tabela 32: Resultados do *test-t* referente aos valores médios de Cu, Fe, Zn e Mn nos tecidos de glândulas mamárias caninas saudáveis e na presença de neoplasia.

Amostras	Metal	<i>t</i> calculado	<i>P</i>	IC
M1	Cu	1,41 [*]	0,231	(-0,0978 – 0,3004)
M2		0,48 [*]	0,656	(-0,678 – 0,478)
M3		6,37 [*]	0,003	(1,289 – 3,284)
M4		1,03 [*]	0,359	(-0,544 – 0,248)
M5		0,01 [*]	0,989	(-0,1409 – 0,1424)
M6		66,16 [*]	0,000	(6,1896 – 6,7319)
M7		0,43 [*]	0,687	(-0,728 – 0,998)
M8		21,08 ^{**}	0,002	(-3,819 – -2,525)
M9		2,02 [*]	0,113	(-1,608 – 0,253)
M10		4,82 [*]	0,009	(0,252 – 0,936)
M11		7,77 [*]	0,001	(-1,435 – -0,680)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303; * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
M1	Fe	12,10	0,000	(-94,73 – -59,37)
M2		0,62	0,566	(-99,6 – 63,1)
M3		5,20	0,007	(-73,93 – -22,45)
M4		7,54	0,002	(22,54 – 48,83)
M5		4,96	0,008	(26,2 – 92,7)
M6		5,23	0,006	(-129,2 – -39,6)
M7		1,60	0,185	(-174,8 – 47,0)
M8		4,41	0,012	(-129,6 – -29,5)
M9		15,13	0,000	(54,39 – 78,83)
M10		2,52	0,066	(-2,6 – 53,2)
M11		1,39	0,236	(-52,3 – 17,3)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
M1	Zn	2,83 [*]	0,047	(0,43 – 44,35)
M2		1,36 [*]	0,246	(-2,31 – 6,72)
M3		9,86 [*]	0,001	(2,119 – 3,781)
M4		1,04 [*]	0,356	(-0,3062 – 0,1389)
M5		27,34 [*]	0,000	(5,239 – 6,423)
M6		0,13 [*]	0,906	(-1,117 – 1,223)
M7		0,93 [*]	0,404	(-3,87 – 1,93)

(Continua)

(Continuação)

Tabela 32: Resultados do *test-t* referente aos valores médios de Cu, Fe, Zn e Mn nos tecidos de glândulas mamárias caninas saudáveis e na presença de neoplasia.

Amostras	Metal	<i>t</i> calculado	<i>p</i>	IC
M8		4,77*	0,009	(-9,74 – -2,57)
M9		0,61*	0,572	(-1,995 – 1,272)
M10	Zn	3,63*	0,022	(0,507 – 3,788)
M11		11,24**	0,008	(-3,209 – -1,432)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303; * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
M11	Mn	3,55	0,024	(-0,1956 – 0,0240)

Como pode ser verificado na Tabela 32, para a determinação de Cu, as amostras M1, M2, M4, M5, M7 e M9 não apresentaram diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e neoplásicos, pois apresentam *t*_{observado} menor que o *t*_{crítico}, $p > 0,05$ e com os IC incluindo o zero. Já as amostras M3, M6, M8, M10 e M11 têm diferenças significativas entre os tecidos, pois apresentam *t*_{observado} maior que o *t*_{crítico}, $p < 0,05$ e os IC não incluem o zero. As diferenças entre estes animais foram permitidas de serem observadas devido à similaridade entre as idades dos animais, os quais se mantiveram no intervalo de 4,0 a 5,5 anos, isto expondo estes a fatores etiológicos por mais tempo (OLIVEIRA, et al., 2003), também em todas as amostras (M3, M6, M8 e M11) o fator ração estava presente permitindo associar a ração como fator predisponente em sua formulação (SANTOS et al, 2007; NARDI, et al, 2002). Na amostra M10 o fator ração não estava presente, porém o adenocarcinoma misto maligno nodular necessita de estroma parenquimatoso para o desenvolvimento e crescimento neoplásico, o que para isto necessita dos elementos em estudo para a conformação tecidual do processo neoplásico, as mesmas variações neoplásicas de adenocarcinoma foram observados nos outros diagnósticos, porém o desenvolvimento vascular inflamatório favorece a distribuição dos elementos e a formação epitelial papilar, que indica de que o processo neoplásico distribui-se difusamente entre os vários tecidos de composição do órgão, isso impedindo o acúmulo focal dos elementos em estudo (FILQUEIRA et al., 2005; FELICIANO et al., 2012).

Para as determinações de Fe, as amostras de glândula mamária M2, M7, M10 e M11 não apresentaram diferenças significativas entre os tecidos de um mesmo animal (saudáveis e com neoplasias), pois apresentam *t*_{observado} menor que o *t*_{crítico} e $p > 0,05$. Já

as amostras M1, M3, M4, M5, M6, M8 e M9 têm diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e com neoplasias para o metal Fe. As diferenças entre as concentrações de Fe nos tecidos normais e com neoplasia justificam-se, pois as classificações histopatológicas relacionam processos com presença de proliferação vascular e manutenção de reação inflamatória, estando o elemento Fe atuante na vascularização, pois fazem parte do componente circulatório como eritrócitos e atuam na integridade de parede de vasos. As classificações mistas demonstram o desenvolvimento da neoplasia associada aos tipos de tecido embrionário pertencente ao desenvolvimento da glândula mamária e desta forma o elemento Fe é necessário para a distribuição vascular na organização dos tecidos formando neoplasias mistas, sejam papilares e/ou nodulares (SAKAMOTO, 2011).

Com relação ao Mn, a única amostra que foi detectado esse metal foi a M11 que apresentou diferença significativa entre o tecido saudável ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) e o tecido com neoplasia ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$). As demais amostras não foram analisadas, pois tiveram seus valores não detectados ou menores que o LD. Os teores de Zn não foram significativos entre as amostras M2, M4, M6, M7 e M9, no entanto, as amostras M1, M3, M5, M8, M10 e M11 apresentam *observado* maior que o *crítico* e $p < 0,05$ indicando que são concentrações de Zn diferentes entre os tecidos.

Na Tabela 33 estão apresentados os resultados do *teste-t* para os íons Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos de pâncreas com seus respectivos intervalos de confiança (IC).

Tabela 33: Resultados do *teste-t* contendo as médias, por amostra, para Cu, Fe, Mn e Zn em pâncreas saudáveis e na presença de neoplasia.

Amostras	Metal	Tobservado	P	IC
PA1	Cu	70,26**	0,000	(1,3423 – 1,5174)
PA2		3,81*	0,019	(-10,68 – -1,67)
PA3		5,73*	0,005	(0,298 – 0,857)
PA4		3,36*	0,028	(0,0482 – 0,5049)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303 * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
PA1	Fe	33,29**	0,001	(26,591 – 34,485)
PA2		3,89*	0,018	(11,9 – 71,4)
PA3		11,88*	0,000	(50,37 – 81,09)
PA4		3,31*	0,030	(-13,51 – -1,19)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303 * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
PA2	Mn	4,50	0,011	(-0,96 – -0,229)
PA3		10,71	0,000	(0,6074 – 1,0328)
PA4		2,19	0,094	(-0,0297 – 0,2500)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
PA1	Zn	12,86**	0,006	(2,467 – 4,947)
PA2		6,00*	0,004	(-23,79 – -8,73)
PA3		1,98*	0,119	(-62,2 – 10,4)
PA4		0,13*	0,901	(-1,299 – 1,430)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303 * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				

Todas as amostras de pâncreas avaliadas (PA1, PA2, PA3 e PA4) apresentaram diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e com neoplasias para os metais Cu e Fe, pois apresentaram *tobservado* maior que o *tcrítico*, $p < 0,05$ e IC que não inclui o zero. Para o Mn, as amostras PA2 e PA3 possuem diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e neoplásicos, na amostra PA1 não foi detectado Mn. Na determinação de Zn observou-se que PA1 e PA2 apresentaram diferenças significativas entre os tecidos analisados.

O desenvolvimento de neoplasia em pâncreas altera o metabolismo celular, necessitando as células com mitoses atípicas de maiores substratos para o seu desenvolvimento e principalmente para que ocorra a organização tecidual (JAMIESON, et

al., 2010). Desta forma o Fe estaria associado ao desenvolvimento vascular, o Cu a manutenção e controle da hemorragia, Zn e Mn para o desenvolvimento de tecido estromático de suporte como tecido conjuntivo (YANG et al., 2009; SANDBERG, 2011).

As diferenças referentes ao Zn nas amostras de PA1 e PA2 justificam-se, pois para desenvolver o adenocarcinoma existe a necessidade de organização tecidual com formação e proliferação de tecido conjuntivo para que a neoplasia organize-se em lobos como é a distribuição do tecido normal, e esta diferença não ocorreu no PA4, embora seja a mesma neoplasia, a amostra PA4 só ingeria comida caseira e desta forma pode ter contribuído para que não ocorresse a diferença de Zn, porém nas amostras PA1 e PA2 pode ter ocorrido interferência da ingestão de ração. Para o elemento Mn a diferença das amostras PA2 e PA3 justificam-se, pois para o desenvolvimento de angiogênese em neoplasia é necessário metabolismo celular intenso associado à atividade de mitocôndrias, estando este elemento associado a este fator na amostra PA3, e o adenocarcinoma no PA2 necessita de uma organização tecidual acelerada tendo a contribuição da formação destes grupamentos celulares neoplásicos dependentes do desenvolvimento de tecido estromal (YANG et al., 2009; SANDBERG, 2011; BEDOYA, et al., 2016).

A Tabela 34 apresenta os resultados estatísticos para os tecidos de pele canina saudável e contendo neoplasias. Não foi feito *teste-t* das amostras de pele para o metal Mn, pois este metal não foi detectado nas amostras.

Tabela 34: Resultados do *teste-t* contendo as médias, por amostra, para Cu, Fe e Zn em pele saudável e com neoplasia.

Amostras	Metal	Tobservado	P	IC
P1		3,17	0,034	(0,0278 – 0,4185)
P2	Cu	1,89	0,132	(-0,530 – 0,101)
P3		22,11	0,000	(-2,2113 – -1,7179)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
P1		9,47	0,001	(-129,6 – -70,8)
P2	Fe	2,23	0,089	(-22,46 – 2,43)
P3		1,49	0,210	(-18,12 – 5,46)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
P1		7,32	0,002	(3,697 – 8,217)
P2	Zn	1,10	0,332	(-4,20 – 1,81)
P3		2,40	0,074	(-4,210 – 0,303)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				

Como pode ser verificado na Tabela 34, as amostras de pele P1 e P3 apresentaram diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e com neoplasias para o metal Cu, enquanto que, somente a amostra P1 foi diferente das demais para os metais Fe e Zn.

A diferença entre tecido normal e neoplásico para Cu em P1 e P3 justifica-se, pois ambos os processos neoplásicos necessitam deste elemento para manutenção da integridade tecidual não permitindo a ocorrência de hemorragias e favorecendo organização tecidual, este elemento não foi encontrado em P2, pois o mesmo não é neoplásico e a organização deste é epitelial e desta forma com a mínima vascularização, as diferenças entre Cu, Fe e Zn em P1 justificam-se, pois o processo neoplásico é benigno e requer organização tecidual o que é dependente de Zn, a atuação do Cu e Fe é para manter a integridade vascular e diminuir a ocorrência de hemorragia local, sendo estes elementos necessários na fase inicial do desenvolvimento da organização tecidual (RÊGO, 1997; MUNHOZ et al., 2015).

A Tabela 35 apresenta os resultados estatísticos para as amostras de testículos canino.

Tabela 35: Resultados do *teste-t* com as médias para Cu, Fe, Mn e Zn em testículo canino com e sem neoplasia.

Amostras	Metal	<i>t</i> observado	P	IC
T1	Cu	4,08	0,015	(-0,4365 a -0,0828)
T2		3,07	0,037	(0,0087 a 0,1710)
T3		9,93	0,001	(0,767 a 1,362)
T4		22,60	0,000	(-0,3670 a -0,2867)
T5		23,53	0,000	(0,2243 a 0,2843)
T6		4,01	0,016	(-0,1162 a -0,0211)
T7		0,31	0,770	(-0,255 a 0,319)
T8		3,60	0,023	(-0,1372 a -0,0178)
T9		4,47	0,011	(-0,4446 a -0,1041)
T10		3,03	0,039	(-0,0992 a -0,0044)
T11		3,57	0,023	(0,0271 a 0,2167)
T12		0,45	0,673	(-0,0576 a 0,0802)
T13		1,63	0,177	(-0,0407 a 0,1572)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
T1	Fe	1,17*	0,307	(-23,85 a 9,72)
T2		3,62*	0,022	(1,67 a 12,62)
T3		0,52*	0,627	(-67,1 a 45,8)
T4		0,31*	0,774	(-2,708 a 2,168)
T5		12,91*	0,000	(5,010 a 7,757)
T6		5,35*	0,006	(1,097 a 3,461)
T7		5,42**	0,032	(-9,85 a -1,13)
T8		8,93*	0,001	(-5,278 a -2,774)
T9		4,11*	0,015	(-13,16 a -2,55)
T10		13,57*	0,000	(17,62 a 26,69)
T11		7,41*	0,002	(3,798 a 8,345)
T12		0,53*	0,624	(-2,66 a 3,91)
T13		6,96*	0,002	(-3,600 a -1,547)
** <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303 * <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				

(Continua)

(Continuação)

Tabela 35: Resultados do *teste-t* com as médias para Cu, Fe, Mn e Zn em testículo canino com e sem neoplasia.

Amostras	Metal	<i>t</i> observado	<i>p</i>	IC
T8	Mn	5,50	0,005	(0,0440 a 0,1337)
T9		-2,74	0,052	(-0,1415 a 0,0009)
T11		-5,61	0,005	(-0,1326 a -0,0448)
<i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				
T1	Zn	15,33 ^{**}	0,004	(-5,376 a -3,020)
T2		15,07 [*]	0,000	(3,133 a 4,547)
T3		3,50 [*]	0,025	(1,00 a 8,75)
T4		6,70 [*]	0,003	(1,963 a 4,739)
T5		13,72 [*]	0,000	(1,659 a 2,501)
T6		0,74 [*]	0,499	(-0,354 a 0,613)
T7		0,53 [*]	0,626	(-3,128 a 2,130)
T8		4,55 [*]	0,010	(0,368 a 1,518)
T9		7,10 [*]	0,002	(-7,572 a -3,315)
T10		2,72 [*]	0,053	(-1,499 a 0,017)
T11		1,26 [*]	0,277	(-1,958 a 0,737)
T12		15,99 [*]	0,000	(1,521 a 2,161)
T13		1,92 [*]	0,128	(-0,217 a 1,185)
^{**} <i>t</i> crítico (0,05, 2) = 4,303 [*] <i>t</i> crítico (0,05, 4) = 2,776				

Como podem ser verificados, as amostras de testículo T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9, T10 e T11 apresentaram diferenças significativas entre os tecidos saudáveis e com neoplasias para o metal Cu, pois apresentam *t*observado maior que o *t*crítico e $p < 0,05$. Já as amostras T2, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T13 apresentaram-se diferentes para o Fe. O Mn foi detectado apenas em três amostras de testículos (T8, T9 e T11), e destas se diferenciaram as amostras T8 e T11. Na determinação de Zn, entre tecidos sadios e doentes, mostraram-se diferentes as amostras T1, T2, T3, T4, T5, T8, T9 e T12. O processo neoplásico testicular ocorre em associado tanto a tecido de sustentação, sertoliomas, quanto ao de células germinativas, seminomas, e como o desenvolvimento neoplásico local favorece o desenvolvimento rápido de inflamação e a morte celular local, necrose, os

metais estudados podem estar sendo consumidos pelos fatores inflamação, Cu e Fe, e necrose, Mn e Zn (CHAMMAS, 2009; FELIPPE, 2008).

Várias amostras avaliadas neste trabalho apresentaram diferenças significativas quando comparado a fração saudável do tecido com a neoplásica, no entanto, não sugeriram um padrão. Portanto, não foi possível concluir que os metais estudados tenham uma forte influência no surgimento ou não das neoplasias presentes nestas amostras.

Para auxiliar na interpretação dos resultados foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP), que é uma ferramenta muito empregada na presença de um número grande de dados, pois reconhece as variáveis novas, que aparecem das combinações lineares das variáveis originais, possibilitando a visualização da existência de correlação entre as variáveis medidas (SABIN et al., 2004).

A ACP foi aplicada aos dados experimentais dos teores de Cu, Fe e Zn determinados nas 31 amostras de tecido animal (glândula mamária, pâncreas, pele e testículo) para verificar as possíveis semelhanças e/ou diferenças entre as mesmas e sua correlação entre as variáveis. O metal Mn não foi analisado na ACP, pois não foi encontrado na maioria das amostras. Os gráficos da ACP explicaram 46,91% pelo fator 1 e 32,51% pelo fator 2, totalizando 79,42% de explicação dos dados.

A Figura 3 (A) apresenta o gráfico das variáveis estudadas, onde pode-se observar pelo fator 1 que as espécies metálicas Cu e Fe estão inversamente correlacionados com Zn, enquanto que pelo fator 2 os metais Cu, Fe e Zn são diretamente correlacionados.

A Figura 3 (B) apresenta o gráfico das amostras na ACP apontando as diferenças entre os tecidos de glândula mamária, pâncreas, pele e testículo caninos saudáveis e com neoplasia (as amostras com neoplasia estão identificadas com a letra C).

Observou-se que as amostras M3, M6, M8, M9 e PA2 e M6C, M3C, M9C, PA2C e T3C estão localizadas no quadrante negativo de x e positivo de y, e se caracterizaram por apresentar elevado teor de Cu.

As amostras PA3, PA3C, M1C e a maioria das amostras de testículos saudáveis e com neoplasia estão localizadas no quadrante positivo de x e positivo de y, apresentando maiores teores de Zn.

As demais amostras situadas nos quadrantes opostos às demais, apresentaram teores mais baixos dos metais determinados.

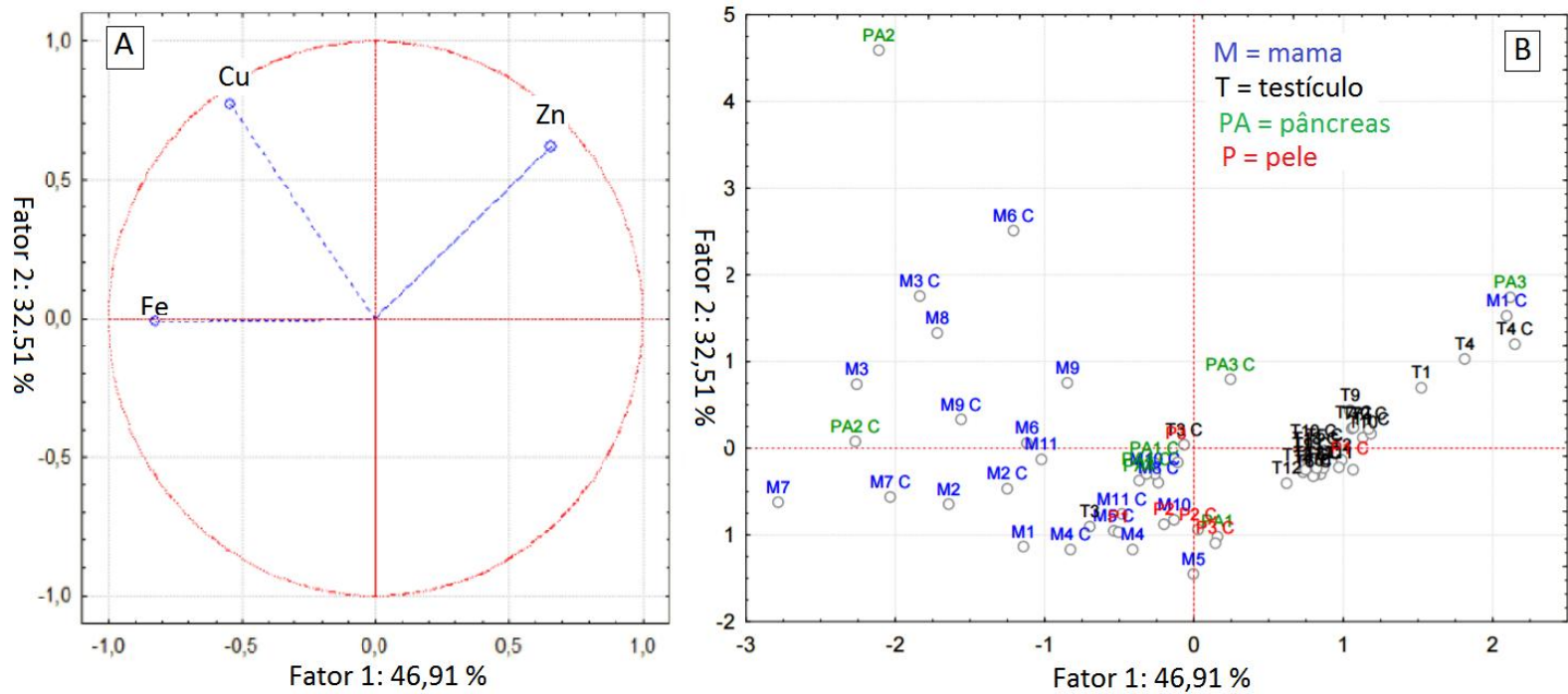


Figura 3: Gráfico das variáveis (A) e gráfico das amostras envolvendo diferentes tecidos caninos (B) (amostras com neoplasia estão identificadas com a letra C).

Apesar dos vários tecidos biológicos apresentarem concentrações distintas entre as amostras de um mesmo animal com e sem neoplasias, a ACP fez distinção apenas em relação ao tipo de tecido e o teor da espécie metálica, isto é, a ACP separou, pelo fator 1, todas as amostras de testículos (eixo X) das amostras de glândula mamária (eixo Y), indicando que os tecidos de testículo possuem maiores concentrações de Zn, enquanto que os tecidos de mama se correlacionaram com os teores de Fe e Cu. As amostras de pele não apresentaram correlação forte com os metais, pois o grupo de amostras encontra-se próximo de zero nos eixos X e Y. Com relação as amostras de pâncreas, não foi observado um padrão, pois as mesmas encontraram-se distribuídas entre os quadrantes da ACP.

A ACP indicou que o Fe e Cu se correlacionam entre si, pois quando há um aumento de Cu no tecido, o teor de Fe também aumenta. A literatura cita que o Zn possui um papel anti-carcinogênico, pois atua juntamente com radicais livres no combate a iniciação de tumores (FOUANI et al., 2017). Raju et al. (2017), associaram o aumento da concentração de Fe ao desenvolvimento e progressão de tumores. Também sugeriram que o Cu pode estar relacionado com a progressão do tumor através da angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos. Rahman et al., (2012) verificaram que há um grande aumento da concentração de Fe no tecido mamário canceroso em comparação com tecido saudável (23,5 para 166,9 mg/L). Raju et al., (2017) encontraram níveis elevados de Fe e Cu em câncer de reto quando comparado com tecido saudável. Carvalho et al., (2007) verificou que as concentrações de Cu, Fe e Zn foram mais elevadas nos tecidos de mama humano com neoplasia em comparação aos tecidos normais. Em tecidos pulmonares com câncer, os elementos que sugerem ser importantes foram o Fe, Cu e Zn, pois estes apresentaram valores de concentração aumentados. Em amostras intestinais, o elemento que apresentou concentração aumentada nos tecidos cancerosos foi o Cu. Já em tecidos de próstata, os elementos Mn, Cu e Zn mostraram-se elevados nas partes contendo tumores. Zoriy et al., (2008) determinaram um aumento de Cu e Zn em amostras de cérebro de rato com câncer e uma pequena diminuição de Fe no tecido tumoral. Mulware (2013) encontrou diferenças significativas nas concentrações de diversos metais, dependendo do órgão avaliado.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível otimizar duas metodologias analíticas (digestão ácida e solubilização alcalina) para o preparo de amostras biológicas (tecido animal) e posterior determinação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. Os parâmetros avaliados no estudo de validação (linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão) encontram-se dentro dos critérios recomendados para os dois métodos. Embora os dois métodos tenham apresentado eficiente exatidão e precisão, o método selecionado para as determinações de Cu, Fe, Mn e Zn em tecido animal foi o da solubilização alcalina, que requer menor tempo de preparo e menor volume de reagente. Além disso, a solubilização alcalina foi eficiente na eliminação das gorduras provenientes da matriz, enquanto que, na digestão ácida surgiam gotículas de gorduras suspensas em solução após o resfriamento das amostras digeridas.

Entre os tecidos animais analisados (31 amostras de espécie canina), observou-se diferenças significativas nas concentrações dos metais Cu, Fe, Mn e Zn em muitas amostras quando comparado o tecido saudável com o tecido neoplásico, porém essas diferenças não seguiram um padrão definido, impossibilitando concluir se os mesmos apresentam influência no surgimento das neoplasias presentes nas amostras de glândulas mamárias, testículos, pâncreas e pele, embora não estejam associado a etiologia da neoplasia, estes podem contribuir com a organização tecidual e desenvolvimento de alguns processos neoplásicos, dependendo da classificação morfológicas destes, porém isto não foi possível de ser observado em neoplasias testiculares pela grande alteração vascular e tecidual observada, isto posto pela própria característica histológica do órgão.

Desta forma, embora os metais estejam em tecidos normais, pois participam de processos fisiológicos no organismo, a falta de um padrão no aumento ou na diminuição das concentrações dos metais entre os tecidos doentes e os saudáveis pode ser explicada pelas diferenças de etiologia do processo neoplásico, considerando que a etiologia das neoplasias é multifatorial, bem como, pela grande variação histológica associada ao desenvolvimento das neoplasias. Os processos neoplásicos passam por três fases do desenvolvimento celular: iniciação, promoção, progressão. Os metais, através de alterações bioquímicas celulares, podem participar de qualquer uma dessas fases do desenvolvimento neoplásico, considerando que estes metais auxiliam na função bioquímica celular e desenvolvimento tecidual, os mesmos estão relacionados mais apropriadamente a fase de

promoção e podem diminuir na fase de progressão onde as alterações das neoplasias ocasionam consequências relacionadas a resposta imunológica local, inflamação e necrose, o que pode ter dificultado a mensuração em testículos. Como o desenvolvimento de processos neoplásicos em pâncreas está associado a fatores genéticos e hormonais, a distribuição de metais de forma aleatória pode estar associada à fisiologia do mesmo, não contribuindo com a carcinogênese dos processos neoplásicos estudados.

A Análise de Componentes Principais (ACP) indicou que há correlação entre o Fe e o Cu nas amostras avaliadas, pois quando aumentou o teor de Cu nos tecidos, o teor de Fe também aumentou. A ACP conseguiu agrupar os diferentes tecidos com o teor de íon metálico, indicando que os tecidos de testículo possuem maiores concentrações de Zn, enquanto que os tecidos de glândula mamária se correlacionam com os teores de Fe e Cu. As amostras de pele não apresentaram correlação forte com nenhum dos metais, e as amostras de pâncreas não apresentaram um padrão definido, pois ficaram distribuídas aleatoriamente entre os quadrantes da ACP.

7. REFERÊNCIAS

AKHTER, P.; MOHAMMAD, D.; ORFI, S. D.; AHMAD, N.; REHMAN, K. Assessment of daily iron intake for the Pakistani population. **Nutr. Food Sci.** v.35, p.109–117, 2005.

ALEIXO, G.A.S.; SILVA, C.E.S.; PEREIRA, L.C.; OLIVEIRA, L.K.R.B.; FERNANDES, M.F.T.S.; VAZ, S.G.; MESQUITA, E.P.; CAMPOS, E.M.; LACERDA, M.A.S.; COELHO, M.C.O.C. Seminoma em um cão com hérnia inguinal e testículo ectópico (relato de caso), 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0742-2.pdf>>. Acesso em julho de 2016.

AMORIM, F. A. C.; COSTA, V. C.; SILVA, E. G. P. da; LIMA, D. C.; JESUS, R. M.; BEZERRA, M. A. Multivariate optimization of simple procedure for determination of Fe and Mg in cassava starch employing slurry sampling and FAAS. **Food chemistry**, V. 227, p. 41-47, 2017.

AMORIM, F.A.C.; LOBO, I.P.; SANTOS, V.L.C.S.; FERREIRA, S.L.C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares. **Química Nova**, v.31, p.1784-1790, 2008.

ANDRADE, C. B.; BARROS, A. M.; MAGALHÃES, A. C. P.; CASTRO, L.L.C.; TAKASEI, I.; Comparação dos teores de Cu e Zn em leguminosas cruas e após serem processadas termicamente em meio salino e aquoso. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.24, p. 316-318, 2004.

ANGÉLICO, G.T.; SANTOS, P.C.G. Sertolioma – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ed. 2, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acessado em: junho de 2016.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition. 2012. APÊNDICE F.

ARANHA, T. S. C. P.; OLIVEIRA, A.; QUEIROZ, H. M.; CADORE, S. A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples. **Food Control**, V. 59, p. 447-453, 2016.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, V. 20, p. 638-643, 1997.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental** - 4ª Ed. 2011.

BARROS, R. M.; JACOBINA, G. C.; ECCO, R.; SILVA, C. E. V. da; GALERA, P. D. Carcinoma das células escamosas multicêntrico em cão. **Revista Brasileira de Saúde e produção animal**, V. 9, N. 1, p. 103-108, 2008.

BATISTA, B. L.; GROTO, D.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; JUNIOR, F. B. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**. V. 646, p. 23-29, 2009.

BEDOYA, S.A.O.; CONCEIÇÃO, L.G.; VILORIA, M.I.V.; LOURES, F.H.; VALENTE, F.L.; AMORIM, R.L.; SILVA, F.F. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, V.68, N.1, p. 147-154, 2016.

BENDICHO, C.; CALLE, I. D. L.; PENA, F. COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, V. 31, p. 50- 60, 2012.

BERTOLDI, J.; FRIOLANI, M.; FERIOLI, R.B. Sertolioma em cão associado a criptorquidismo bilateral – relato de caso. **Revista científica de medicina veterinária**, n. 22, 2014.

BETTINI, C.M.; ANAMI, R.M.; ASSIS, M.M.Q.; MONTEIRO, E.R.; HEADLEY, S.A. Alopecia e características fenotípicas de feminização associado a tumor de células de leydig em um cão. **Revista acadêmica**, v. 4, n. 4, p. 25-32, 2006.

BORNHORST, J.; EBERT, F.; HARTWIG, A.; MICHALKE, B.; SCHWERDTLE, T. Manganese inhibits poly (ADP-ribosyl)ation in human cells: a possible mechanism behind manganese induced toxicity. **J. Environ. Monitor.** 12: p.2062–2069, 2010.

BURNIER, J. J. P.; WOLF, M.; BOLONGA, A.; BASILIO, J. S.; SUZUKI, S. R.; DALL'OLIO, A. J. Adenocarcinoma pancreático exócrino primário em cães- relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, V. 12, N. 2, p. 54, 2014.

CARVALHO, M. L.; MAGALHÃES, T.; BECKER, M.; BOHLEN, A. von. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. **Spectrochimica Acta Part B**, V. 62, p. 1004-111, 2007.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em Métodos Cromatográficos para Análises de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CERULLI, N.; CAMPANELLA, L.; GROSSI, R.; POLITI, L.; SCANDURRA, R.; SODA, G.; GALLO, F.; DAMIANI, S.; ALIMONTI, A.; PETRUCCI, F.; CAROLI, S. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in neoplastic kidneys and in renal tissue of fetuses, newborns and corpses. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.20, p. 171-179, 2006.

CHAMMAS, R. Imunologia clinica das neoplasias. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. São Paulo, 2009, p. 447-460.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. *Journal of chromatography A*, V. 1184, p. 191-219, 2008.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000, p. 145-175, 209-219.

DONIA, M.A.A. Lead Concentrations in different animals muscles and consumable organs

at specific localities in Cairo. **Global veterinaria**, v. 2, p.280-284, 2008.

EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; OHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive veterinary medicine**, V. 69, p. 109-127, 2005.

FELICIANO, M. A. R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V.64, N. 5, 2012.

FELIPPE, J. Jr. Desvendando os Segredos do Câncer. **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar**, 2008. Disponível em: www.medicina-complementar.com.br.

FILGUEIRA, K. D.; ARAÚJO, R. W. B.; SILVA, L. D. M. da. Características histopatológicas de neoplasias mamárias em cadelas. **Ciência Animal**, V. 15, p. 119-121, 2005.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, V. 30, N.4, p. 731-735, 2000.

FOUANI, L.; MENEZES, S. V.; PAULSON, M.; RICHARDSON, D. R.; KOVACEVIC, Z. Metals and metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents. **Pharmacological research**, V. 115, p. 275-287, 2017.

FREIRE, C. A. DE L.; CHARNET, E. M. R.; BONVINO, H.; CHARNET, R. **Análise de modelos de regressão linear**. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 1999.

GALLUS, S.; FOSCHI, R.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.V.; RAMAZZOTTI, V.; TAVANI, A.; DAL MASO, L.; LA VECCHIA, C. **Dietary zinc and prostate cancer risk: a case-control study from Italy.** *Eur. Urol.* 52:

p.1052–1056, 2007.

GERUDE, M. **O que você deve saber sobre dietas, vitaminas, sais minerais e ortomolecular.** São Paulo, 1995, 106p.

GHISI, M.; CHAVES, E. S.; QUADROS, D. P. C.; MARQUES, E. P.; CURTIUS, A. J.; MARQUES, A. L. B. Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**, V. 98, p. 62-65, 2011.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, p. 1995-1998, 2010.

GUAN, H.; PIAO, F.; LI, X.; LI, Q.; XU, L.; YOKOYAMA, K. Maternal and fetal exposure to four carcinogenic environmental metals. **Biomedical and environmental sciences**, v.23, p. 458-465, 2010.

GUILHEN, S. N.; PIRES, M. A. F.; DANTAS, E. S. K.; XAVIER, F. V. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). Estudo de caso. **Química Nova**, V. 33, N. 6, p. 1285-1290, 2010.

GROMBONI, C.F. **Teores dos elementos químicos essenciais e tóxicos na rastreabilidade da carne bovina.** 2012. 119p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

HENDLER, S.S. **A enciclopédia de vitaminas e minerais.** Rio de Janeiro, 1997, 576p.

HERMO, G. A.; TORRES, P.; RIPOLL, G. V.; SCURSONI, A. M.; GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; GOBELLO, C. Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study. **The veterinary journal**, V. 178, p. 103-108, 2008.

HINDLEY, C. J.; ESPINOZA, L. C.; HUCH, M. Organoids from adult liver and pancreas: Stem cell biology and biomedical utility. **Developmental biology**, V. 420, p. 251- 261, 2016.

HOENIG, M.; KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, p.1297-1307.1996.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz.** São Paulo. IV ed. 2º ed. digital. 2008.

ICH – International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96), 1996.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; DOQ-CGCRE-008, Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Fevereiro, 2010. Disponível em: www.inmetro.gov.br. Acesso em: dezembro de 2016.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P. do; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med**, p. 125-131, 2010.

JAMIESON, N. B.; FOULIS, A. K.; OIEN, K. A.; GOING, J. J.; GLEN, P.; DICKSON, E. J.; IMRIE, C. W.; MCKAY, C. J.; CARTER, R. Positive Mobilization Margins Alone Do Not Influence Survival Following Pancreatic-Duodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Annals of Surgery**, V. 251, N. 6, p. 1003-1010, 2010.

JUROWSKI, K.; KOCHAN, K.; WALCZAK, J.; BARANSKA, M.; PIEKOSZEWSKI, W.; BESZEWSKI, B. Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics: State of the art. **Trends in Analytical chemistry**, V. 86, p. 276-289, 2017.

KUNZLER, K. C.; D'AVILA, G. F. L.; SESSEGOLO, G.; FARACO, M.; STEFANELLO, C.; CAMPOS, B. Adenocarcinoma pancreático em um cão: relato de caso. **Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, V. 11, N. 3, p. 78-79, 2013.

KUO, Y. M.; SU, T.; ATTIEH Z.; SYED, B. A.; MCKIE, A. T.; ANDERSON, G. J.; GITSCHIER, J.; VULPE, C. D. Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse. **Int. J. Gastroenterol. Hepatol.** p.201–206. 2004.

LAN, Y.; XIAO, K.; WU, Y.; CHEN, Q. Characterization, catalyzed water oxidation and anticancer activities of a NIR BODIPY-Mn polymer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, V. 177, p. 28-32, 2017.

LAPPANO, R.; MALAGUARNERA, R.; BELFIORE, A.; MAGGIOLINI, M. Recent advances on the stimulatory effects of metals in breast cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, p. 1-8, 2016.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Serial Review: Redox-Active Metal Ions, Reactive Oxygen Species, and Apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n.12, p. 1921-1942, 2004.

LOPES, S.R.A. **Neoplasias testiculares em canídeos observadas no hospital veterinário doutor Marques de Almeida**. Tese (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2011.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química nova**, V. 21, p. 459-466, 1998.

MAGALHÃES, T.; CARVALHO, M. L.; BOHLEN, A. von.; BECKER, M. Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast, and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications. **Spectrochimica Acta Part B**, V. 65, p.493-498, 2010.

MARCATO, J. A.; SONNE, L.; OLIVEIRA, E. C. de. PAVARINI, S. P.; OLIVEIRA, M. B.; TEIXEIRA, E. M.; PEREIRA, E. S.; DRIEMEIER, D. Estudo retrospectivo das doenças pancreáticas em cães necropsiados pelo setor de patologia veterinária da UFRGS. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 21- 27 de outubro de 2007, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

MARTINS, I.S.B. **Avaliação da influência da matéria orgânica, na determinação quantitativa de metais em amostras de sedimento, por espectrometria de absorção atômica e análise de metais traços por fluorescência de raios-x.** 2011. 91p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; KEMIECIKI, G. A. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, V. 470, p. 195-204, 2002.

MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B.; Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. **Microchemical Journal**, V. 76, p. 23-39, 2004.

MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA, E. C.; RODRIGUES, B. A.; COSTA, G. R.; SONNE, L.; TESSER, E. S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesq. Vet. Bras**, V. 30, p. 968-973, 2010.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo. 2000.

MONTEIRO, D.M. **Análise de elementos traços por absorção atômica de forma quantitativa e qualitativa: uma investigação do valor nutricional de leites humanos que abastecem o banco de leite do estado do Amapá.** 2013. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP.

MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro. 2008.

MULWARE, S. J. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. Review Article. **Journal of Biophysics**, p. 8, 2013.

MUNHOZ, P.M.; PERES, J.A.; ALMEIDA, A.A.; SAKATE, M. Intoxicação por Metais Pesados. IN: JERICO, M.M.; ANDRADE NETO, J.P.; KOGIKA, M.M. **Tratado de Medicina Interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: ROCA. 2015, p. 632-640.

NATALINO. R. **Caracterização De Açúcar Mascavo Aplicando Análise Das Componentes Principais (Pca) A Dados Espectrométricos**. 2006. 62 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. MG

NARDI, A. B. de; ROBASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos de cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, V. 7, N. 2, p. 15-26, 2002.

NATA (National Association of Testing Authorities) – Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods. Australia, 2012.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer Experimentos**. 4ª Edição. Editora Bookman, 2010.

NOGUEIRA, A.R.A. Novas perspectivas para os laboratórios da Embrapa: sistema da qualidade e certificação pela ISO 9001-2000. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE MÉTODOS DOS LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, VIII. Jaguariúna, São Paulo, 2003. s.d. p.1-20.

NUNES, A.M.; SOUSA, R.A.; SILVA, C.S.; PEIXOTO, R.R.A.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S.; CADORE, S. Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 32, p. 1-5, 2013.

NUNES, A. M.; ACUNHA, T. S.; ORESTE, E. Q.; LEPRI, F. G.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. RIBEIRO, A. S. Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.** V. 22, N. 10, p. 1850-1857, 2011.

OE, S.; MIYAGAWA, K.; HONMA, Y.; HARADA, M. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. **Experimental Cell Research**, V. 347, p. 192-200, 2016.

OLIVEIRA, L. O. de; OLIVEIRA, R. T. de; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta scientiae veterinariae**. V. 31, N. 2, p. 105-110, 2003.

PLIEGO, C. M.; FERREIRA, M. L. G.; FERREIRA, A. M. R.; CHAUDON, M. B. O. Qualidade diagnóstica da biópsia com agulha Super-core II de nódulos mamários de cadelas. **Ciência Rural**, V. 38, N. 8, p. 2203-2209, 2008.

RAHMAN, S. Correlation study of trace metals in malignant and normal breast tissues by AAS technique. **Radiology and nuclear medicine**, V. 123, p. 24, 2012.

RAJU, G. J. N.; SARITA, P.; MURTHY, K. S.R. Comparative trace elemental analysis of cancerous and non-cancerous tissues of rectal cancer patients using PIXE. **Nuclear Instruments and Methods in Physics research B**, 2017.

RANIERI, G.; PANTALEO, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; MUTINATI, M.; MARECH, I.; PATRUNO, R.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours with special reference to breast cancer: A comparative review. **Oncology Hematology**, V. 88, p. 293-308, 2013.

RÊGO, Marco Antônio V. Cancer epidemiology and prevention. **Cadernos de Saúde Pública**, V. 13, p. 111-112, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5. p. 771–780, 2004.

RIBAS, C. R.; DORNBUSCH, P. T.; FARIA, M. R.; WOUK, A. F. P. F.; CIRIO, S. M. Alterações clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. **Archives of veterinary science**, V. 17, N. 1, p. 60-68, 2012.

RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; SILVA, A. F.; BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; HEITMANN, U.; CURTIUS, A. J. Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment. **Spectrochimica Acta Part B**, V. 60, p. 693-698, 2005.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, V. 31, N. 1, p. 164-171, 2008.

RIBEIRO, R. F. L.; GERMANO, A. Development and validation of a method for the determination of Hg in animal tissue (equine muscle, bovine kidney and swine kidney, and poultry muscle) by direct mercury analysis (DMA). **Microchemical Journal**, V. 121, p. 237-243, 2015.

RITSU, M.; KAWAKAMI, K.; KANNO, E.; TANNO, H.; ISHII, K.; IMAI, Y.; MARUYAMA, R.; TACHI, M. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, V. 21, p. 14-19, 2017.

ROBERTO, G. B.; MAGRO, A. L.; SEKI, M. C.; TRANQUILIM, M. V.; ZILIOTO, L. Carcinoma de pâncreas exócrino com hipoglicemia em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, V. 44, N. 141, p. 1-5, 2016.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, V. 40, N. 3, p. 387-396, 2004.

SAGHIRI, M. A.; ASATOURIAN, A.; ORANGI, J.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis – Part I: N, Fe, Se, P, Au, and Ca. **Oncology/Hematology**, v. 96, p. 129-142, 2015.

SAKAMOTO, S. S. **Identificação de elementos traços em tumores de mama de cadelas e sua correlação com histopatologia e prognóstico de vida**. 2011. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UNESP, Araçatuba, SP.

SANDBERG, A.A. Pancreatic cancer: Animal model and molecular biology. **N. Am. J. Med. Sci.** V. 3, N. 10, p. 441- 450, 2011.

SANTOS, L. C. dos; RODRIGUES, B. A.; OLIVEIRA, R. T. de; RODRIGUES, J. L. Tumores das glândulas mamárias em cadelas. **MEDVEP: rev. cient. med. vet.** V. 5, p. 168-178, 2007.

SANTOS, R.J.; SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.F.C.; SERAKIDES, R. Tumores testiculares em cães: frequência e distribuição etária. **Medicina veterinária e zootecnia**, v. 52, n.1, 2000.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. ENQUALAB-2006- Congresso e Feira da qualidade em metrologia, 30 de maio a 01 de junho de 2006, São Paulo, Brasil.

SILVA, J. B. B. da; BORGES, D. L. G.; VEIGA, M. A. M. S. da; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier. **Talanta**, V. 60, p. 977-982, 2003.

SILVA, L. C.; STRIXINO, J. F.; FONTANA, L. C.; GONSALVEZ, A. M. R.; SERRA, A. C.; PINEIRO, M. CANEVARI, R. A. Molecular analysis of apoptosis pathway after photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, V. 14, p. 152-158, 2016.

SKRAJNOWSKA, D.; BOBROWSKA, B.; TOKARZ, A.; KURAS, M.; RYBICKI, P.; WACHOWICZ, M. The effect of zinc and copper sulphate supplementation on tumor and hair concentrations of trace elements (Zn, Cu, Fe, Ca, Mg, P) in rats with DMBA induced breast cancer. **Pol. J. Environ. Stud.** v. 20, n. 6, p. 1585-1592, 2011.

SKRAJNOWSKA, D.; BOBROWSKA, B.; TOKARZ, A.; KAZIMIERCZUK, A.; KLEPACZ, M.; MAKOWSKA, J.; GADZINSKI, B. The effect of zinc and phytoestrogen supplementation on the changes in mineral content of the femur of rats with chemically induced mammary carcinogenesis. **Journal of trace elements in medicine and biology**, V. 32, p. 79-85, 2015.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The veterinary clinics**, V. 33, p. 573-596, 2003.

SOUZA, R. A. de; SABARENSE, C. M.; PRADO, G. L.P.; METZE, K.; CADORE, S. Lead biomonitoring in different organs of lead intoxicated rats employing GF AAS and different sample preparations. *Talanta*, V. 104, p. 90-96, 2013.

SOUZA, T. M. de; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. de. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, V. 36, N. 2, p. 555-560, 2006.

STIPANUK, M. H.; CAUDILL, M. A. **Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition**. 3ª Edição. Philadelphia: Elsevier Saundre Publishing, 2012.

SZKODA, J.; ZMUDZKI, J. Determination of lead and cadmium in biological material by graphite furnace atomic absorption spectrometry method. **Bull Vet Inst Pulawy**, v.49, p. 89-92, 2005.

TIZIOTO, P. C.; GROMBONI, C. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, M. M.; MUDADU, M. A.; THOLON, P.; ROSA, A. N.; TULLIO, R. R.; MEDEIROS, S. R.; NASSU, R. T.; REGITANO, L. C. A. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. **Meat Science**, V. 96, p. 436-440, 2014.

ULENE, A.; ULENE, V. **Vitaminas – Faça seu plano pessoal**. Blumenau, 1995, 369p.

VALDERSNES, S.; FECHER, P.; MAAGE, A.; JULSHAMN, K. Collaborative study on determination of mono methylmercury in seafood. **Food Chemistry**, V. 194, p. 424-431, 2016.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VIGNERI, R.; MALANDRINO, P.; GIANI, F.; RUSSO, M.; VIGNERI, P. Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 1-8, 2016.

WERNIMONT, G. T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. 1. Ed. Virginia: AOAC International, 1985. 183p.

WU, T.; SEMPOS, C. T.; FREUDENHEIM, J. L.; MUTI, P.; SMIT, E. Serum Iron, Copper and Zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. **AEP**, V. 14, N. 3, p. 195-201, 2004.

YANG, L.; MAO, H.; CAO, Z.; WANG, Y.A.; PENG, X.; WANG, X.; SAJJA, H.K.; WANG, L.; DUAN, H.; NI, C.; STALEY, C.A.; WOOD, W.C.; GAO, X.; NIE, S. Molecular Imaging of Pancreatic Cancer in an Animal Model Using Targeted Multifunctional Nanoparticles. **Gastroenterology**, V. 163, N. 5, p. 1514–1525, 2009.

ZORIY, M. V.; DEHNHARDT, M.; MATUSCH, A.; BECKER, J. S.; Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, V. 63, p. 375-382, 2008.